

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ALEXANDRA MITIRU WATANABE**

**FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DAS HEMOGLOBINAS NAS DOENÇAS  
FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA**

**CURITIBA**

**2015**

**ALEXANDRA MITIRU WATANABE**

**FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DAS HEMOGLOBINAS NAS DOENÇAS  
FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente,  
área de concentração Hemato-Oncologia Pediátrica,  
Farmacêutica.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Albonei Dudeque Pianovski  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**

**CURITIBA**

**2015**

D314 Watanabe, Alexandra Mitiru  
Frequência dos haplótipos das hemoglobinas nas doenças  
falciformes no estado do Parana e evolução clínica / Alexandra Mitiru  
Watanabe. – Curitiba, 2015.  
165 f.: color; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Albonei Dudeque Pianovski  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da  
Criança e do Adolescente. Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná.

1. Doença falciforme. 2. Anemia falciforme. 3. Haplotipos. 4.  
Hemoglobinopatias I. Pianovski, Mara Albonei Dudeque. II. Souza,  
Ricardo Lehtonen Rodrigues de. III. Título.

NLMC: WH 170



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado  
em Saúde da Criança e do Adolescente*



## *Parecer*

A Banca Examinadora, instituída pelo colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a Doutoranda

*Alexandra Mitiru Watanabe*

em relação a sua Tese de Doutorado intitulada:

### **“FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DAS HEMOGLOBINAS NAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**

é de parecer favorável à *Aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de *Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente*,  
Área de concentração em *Hemato-Oncologia Pediátrica - Farmácia-Bioquímica*

Curitiba, 1º. de dezembro de 2015.

*Doutora Mara Alborei Dudeque Pianovski*

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da UFPR; Orientadora e Presidente da Banca Examinadora.

*Doutor Roberto Rosati*

Professor da Faculdade Pequeno Príncipe - PR, Primeiro Examinador.

*Doutor Carlos Alberto Mayora Aita*

Professor Adjunto da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR; Segundo Examinador.

*Doutora Ana Paula Kuczyński Pedro Bom*

Professora Adjunta de Pediatria da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUC-PR; Terceira Examinadora.

*Doutor Rubens Cat*

Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da UFPR; Quarto Examinador.

*Professor Doutor Nelson Augusto Rosário Filho*

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPR

Rua: General Carneiro, 181 - 14º. andar - Alto da Glória - Curitiba - PR - CEP 80060-900

Coordenação: (041) 3360-1863 - e-mail: [monica.lima.ufpr@gmail.com](mailto:monica.lima.ufpr@gmail.com)

Secretaria: (041) 3360-7980 - e-mail: [pgradped@hc.ufpr.br](mailto:pgradped@hc.ufpr.br) - [clara.lara@ufpr.br](mailto:clara.lara@ufpr.br)

*À minha família e àqueles que de alguma maneira,  
possam ser beneficiados com este estudo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao término desta tese, iniciada no fascinante mundo da biologia molecular das doenças falciformes, perpassando pelas origens geográfica e histórica das mesmas e culminado na riqueza dos eventos clínicos, faz-se necessário agradecer - muito e profundamente - àqueles que de todas ou de alguma maneira ajudaram na construção de mais este sonho na minha vida.

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro que permitiu a viabilização deste projeto.

À Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia, pela permissão de utilizar o laboratório do CEGEMPAC (Centro de Genética e Pesquisa Molecular do Câncer da Criança), para a realização dos testes de biologia molecular.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela preparação de reativos e pelo fornecimento de água ultra pura, do laboratório de Preparo de Reagentes do Hospital de Clínicas.

À minha amiga e orientadora, Professora Doutora Mara Albonei Dudeque Pianovski, por me aceitar como sua aluna; pela total disponibilidade em levar este projeto avante; pela extrema paciência e sabedoria, apoio inquestionável nas minhas considerações que foram surgindo à medida em que o projeto foi desenvolvendo. Não existem palavras para agradecer àquela que, um dia em 1994, eu escolhi como minha orientadora na Especialização em Imunologia pela UFPR. Desde então caminhamos juntas no campo da pesquisa. A minha formação como pesquisadora é fruto do trabalho da Dr.<sup>a</sup> Mara. Muito obrigada.

Ao professor Dr. Ricardo Lehtonen de Souza, por aceitar me acompanhar na parte final deste projeto, apoiando-me no desenvolvimento dos *primers* na fase final da identificação dos haplótipos.

À professora Dra Maria Emilia Fávero, pelas orientações iniciais sobre as técnicas de biologia molecular

À bióloga Elis Rosane Sade, pelo repasse da técnica de biologia molecular para os primeiros passos desta caminhada e por ter iniciado a genotipagem dos pacientes desta pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tereza Dantas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que gentilmente enviou-nos amostras de DNA de haplótipos identificados pelo seu grupo de pesquisas, como controle para iniciar a genotipagem no Estado do Paraná.

Aos médicos residentes e efetivos do Ambulatório de Hematopediatria, que fazem ou fizeram parte da equipe da Dra Mara, à Dra Debora Silva Carmo e em especial ao Dr. Tiago Hessel Tormen pela colaboração no preparo das fotos dos géis da PCR- enzimas de restrição.

À Luzia dos Santos, secretária do ambulatório de Hematopediatria-HC por disponibilizar os prontuários dos pacientes.

À Assistente Social do Hemepar, Alneri Pires por fazer as entrevistas com os pacientes e incluí-los na pesquisa.

À enfermeira Simone Peres - Hemepar, pelas sugestões e auxílio em todas as fases desta pesquisa.

À Assistente Social Ielza Maria Tramuja Kafka, da Hematopediatria-HC, por localizar os pacientes para coleta de nova amostra, quando necessário.

Ao Prof. Dr. Roberto Rosati, do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, pelo auxílio nos cálculos iniciais das PCRs e programação inicial do termociclador para a bateria de testes.

Ao Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, por permitir que eu acompanhasse e conhecesse o desenvolvimento da técnica da PCR e de restrição no laboratório do Instituto Pelé-Pequeno Príncipe.

Ao Fábio Sartori - Assessoria Científica da Invitrogen pelas relevantes informações acerca dos *primers*.

À farmacêutica-doutora Miriam Ribas, por introduzir-me no maravilhoso mundo da genética e das enzimas de restrição.

À bióloga Sohaila B.I.Arram que, generosamente, se dispôs a repassar seus conhecimentos na área de biologia molecular.

À Carol, Pati, mestrandas do departamento de Genética da UFPR, por disponibilizar o laboratório e pelo auxílio no manuseio do Termociclador-Gradiente de PCR.

Ao professor Dr. Railson Henneberg, do Curso de Farmácia-Bioquímica da UFPR, por fornecer resultados de alguns pacientes como controle externo para o meu trabalho, e pelo empréstimo de alguns reativos, no final desta pesquisa.

Ao Hemepar: diretor geral Farmacêutico Paulo Roberto Hatschbach e diretora administrativa Eliane Rocha, pelo apoio à realização deste projeto. À Coordenadora da Divisão de Produção, farmacêutica Anália M.B. Machado e aos colegas da Divisão, pela colaboração nos momentos críticos.

Ao presidente da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional - FEPE, Sr. Fábio Marcassa, à coordenadora do laboratório e do Centro de Pesquisas, farmacêutica Mestre Mouseline Torquato Domingos e ao Dr. Ehrenfried O. Wittig, o eterno "pai do Teste do Pezinho" no Estado do Paraná, pelo apoio incondicional e por oferecer condições totais e irrestritas, sem questionamentos para que eu pudesse desenvolver e finalizar este projeto. Sem mais esta ajuda oportuna, teria sido mais difícil a finalização do mesmo. Às amigas e colegas do laboratório do Teste do Pezinho, pelas trocas de idéias e apoio, meu agradecimento.

À minha família - à minha mãe e meu pai (*in memoriam*) - Muito obrigada pelo dom da vida e por me ensinarem os valores éticos e morais. Se hoje estou concluindo esta etapa é porque vocês me deram a educação - e Mãe, obrigada pelo apoio para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos amigos de longe e de perto - pela torcida, pelo apoio e também por entender as minhas ausências físicas e muitas vezes, mesmo presente- ausente, com o pensamento ...nas PCRs e nas enzimas de restrição...

Aos meus tios e minhas primas - parte das minhas raízes! Que bom saber disso!

Aos pacientes, que sempre se dispuseram a colaborar em todas as pesquisas que são realizadas, o meu agradecimento incondicional. Espero, que de alguma forma este trabalho possa contribuir para trazer alguma melhoria na vida de todos vocês.

À *designer* Yolanda Shimizu, pela elaboração dos mapas geográficos.

A Deus - o Princípio de tudo. Sem ELE nada seria possível, e com ELE tudo é possível. A ELE, toda honra e toda a glória, agora e para sempre!



*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

**Introdução:** Dentre as hemoglobinopatias, as doenças falciformes são as mais frequentes na população mundial. A anemia falciforme, a S-talassemia  $\beta$  e a doença da HbSC apresentam gravidade clínica variável, sendo um dos prováveis motivos a presença de polimorfismos na HbS, identificados pelas enzimas de restrição que originarão os haplótipos nominados conforme a origem geográfica CAR, BEN, SENEGAL, CAMARÕES e ARABE-INDIANO. **Objetivos:** identificar os haplótipos das doenças falciformes; suas frequências e distribuição histórico-geográficas no Estado do Paraná, e associação com os eventos clínicos. **Material e método:** Trata-se de estudo transversal, descritivo, qualitativo, quantitativo e analítico para a definição dos haplótipos, sua frequência e distribuição geográfica; associativo na avaliação da interferência dos haplótipos sobre o quadro clínico; observacional e analítico quanto à evolução clínica. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas em papel filtro com técnica utilizada na triagem neonatal, nos ambulatórios de Hematopediatria do HC-UFPR, do Hemepar e das crianças detectadas pelo Programa de Triagem Neonatal no Paraná (SRTN-FEPE-PR). A genotipagem foi realizada no laboratório do CEGEMPAC. A população de pacientes com doença falciforme foi constituída por 100 SS, 45 S $\beta$ , 49 SC. Para a determinação dos haplótipos da globina  $\beta^S$ , foram amplificadas as regiões do grupamento do gene  $\beta^S$  (5' $\gamma^G$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\phi\beta$ , 3' $\phi\beta$ , 5' $\beta$ ) e os polimorfismos, identificados com as enzimas de restrição XmnI, HindIII, HincII e HinfI. Para os haplótipos da  $\beta^C$  globina e talassemia  $\beta$ , além das enzimas acima, utilizou-se Hinc II para a região  $\epsilon$  e Avall e BamHI, para as regiões  $\beta$  e 3' $\beta$ . Os protocolos de trabalho para a HbS foram baseados em Sutton, Bouhassira e Nagel (1989), Lapoumèroulie *et al.* (1992); os haplótipos da talassemia  $\beta$  foram baseados em Orkin *et al.* (1982) e os da HbC segundo Boehm *et al.* (1985). Os haplótipos indeterminados foram considerados "atípicos". Quanto à gravidade clínica, foram analisados os resultados de exames clínico-laboratoriais de 122 pacientes sendo 52 SS, 42 SC e 28 S $\beta$  talassemia, na faixa etária de 0 a 15 anos. **Resultados:** No Paraná, de 100 pacientes SS genotipados, 76,0% foram CAR; 17,5%-BEN; 0,5%-SEN; 0,5%-Camarões e 5,5%-atípicos. Não foi encontrado o haplótipo Árabe-Indiano. Em relação aos 45 pacientes S $\beta$ , foram encontrados: 24,4% com o genótipo CAR/ $\beta$ I, 22,2%- CAR/ $\beta$ II; 4,4%-CAR/ $\beta$ VI, BEN/ $\beta$ atp e Satp/ $\beta$ I; 6,6%-CAR/ $\beta$ IX; 26,6%-CAR/ $\beta$ atp; 2,2%- BEN/ $\beta$ I, BEN/ $\beta$ II e BEN/ $\beta$ IX. Não foram encontrados os haplótipos talassêmicos IV, V, VII e VIII. Em relação à doença da HbSC, em 49 pacientes genotipados: 48,9% foram CAR/CI; 8,1%-CAR/CII; 2,0%-CAR/CIII; BEN/CII e Satp/CI; 30,6-BEN/CI e 6,1%-CAR/Catp. Os haplótipos da HbC foram: 81,6%, CI; 10,2%, CII; 2,1%, CIII e 6,1%, Catp. **Conclusão:** Possivelmente pela miscigenação característica da população brasileira, a gravidade das doenças falciformes não se associou aos haplótipos ou à concentração de HbF; outros polimorfismos na região do grupamento da globina  $\beta$  podem estar interferindo no desenvolvimento da doença. Os registros históricos mostram que os africanos trazidos ao Paraná nos séculos XVIII e XIX são do grupo étnico dos bantos, da região da República Centro Africana. No Paraná, a maior concentração dos africanos ocorreu na região de Antonina e Castro, apesar do baixo número de escravos em relação aos outros estados do Brasil. A Stal  $\beta$  e doença SC estão mais presentes nas regiões norte do estado e na Capital. A predominância do haplótipo CAR no Paraná está em concordância com os eventos históricos. Tanto os haplótipos da talassemia  $\beta$  quanto os da HbC estão associados em maior frequência ao haplótipo CAR da HbS, o que sugere miscigenação entre a HbS, a HbC e a talassemia  $\beta$ .

**Palavras-chave:** Haplótipos. Doença SC, S-talassemia  $\beta$ . Evolução clínica. Estado do Paraná.

## ABSTRACT

**Introduction:** Among hemoglobinopathies, sickle cell diseases are the most frequent occurrences in the population of the world. Sickle cell anemia, S $\beta$  thalassemia and HbSC disease present variable clinical severity, being one of the probable causes of the presence of polymorphism in the sickle cell hemoglobin, identified through enzymes of restriction which will originate the nominated haplotypes according to the geographic origin CAR, BENIN, SENEGAL, CAMARÕES and ARABE-INDIANO. **Objectives:** to identify the haplotypes of the sickle cell disease; their frequencies; historical-geographical distributions in the State of Paraná, and their association with clinical events. **Material and Method:** It is a cross-sectional study, descriptive, qualitative, quantitative and analytical to the haplotypes determination their frequencies and geographical distribution, associative to the evaluation of the haplotypes interference over clinical development; observative and analytical to the clinical evolution. Blood samples were collected in the filter paper according to technique used in the newborn screening program, from patients in the ambulatory of Hematopediatrician of the HC-UFPR and of Hemepar and of the children detected by SRTN-FEPE-CEPE. Genotyping was performed at the laboratory of CEGEMPAC. The population of sickle cell patients was consisted by 100 SS, 45 S $\beta$  and 49 SC. For determination of the haplotypes of the gene of  $\beta^S$ ,  $\beta^C$  and  $\beta$  thalassemia, regions of the cluster of the  $\beta$  gene were amplified (5' $\gamma^G$   $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\phi\beta$ , 3' $\phi\beta$ , 5' $\beta$ ) using the enzyme of restriction XmnI, Hind III, HincII and HinfI. For determination of haplotypes of the  $\beta^C$  globin and S $\beta$  thalassemia, besides the over mentioned enzymes, it was used Hinc II for the region  $\epsilon$ , Avall and BamHI for the regions  $\beta$  and 3' $\beta$ . Protocols of study for the HbS were based on Sutton *et al.* 1989, Lapoumèroulie *et al.* (1992); haplotypes of S $\beta$  thalassemia were based on Orkin *et al.* (1982) and ones of the HbC in accordance to Boehm *et al.* (1985). The haplotypes "indetermined" were considered 'atypical'. In relation to the clinical severity, laboratory results and clinical date of 122 patients were analyzed. Among them, 52 were SS, 42 SC and 28 S $\beta$  thalassemia, between 0 to 15 years of age. **Results:** In Paraná, from 100 patients SS genotyped: 76,0% was CAR, 17,5% was BEN, 0,5% were SEN and CAMEROON and 5,5% were atypical. The haplotype Arabia-Indian was not found in this sample. In relation to the 45 patients S $\beta$  thalassemia, 24.4% were CAR/ $\beta$ I, 22.2% were CAR/ $\beta$ II, 4.4% were CAR/ $\beta$ VI, BEN/ $\beta$ atp and Satp/ $\beta$ I; 6.6% CAR/ $\beta$ IX; 26.6% CAR/ $\beta$ atp; 2.2% were BEN/ $\beta$ I; BEN/ $\beta$ II and BEN/ $\beta$ IX. The thalassemics haplotypes IV, V, VII and VIII were not found. As to HbSC disease of the 49 patients genotypes 65.3% presented the haplotype CAR, 32.6% BEN and 2.1% Satypical. The haplotypes of HbC were 81.6% CI, 10.2% CII; 2.1% CIII and 6.1% Catp. Through the characteristic miscegenation of the Brazilian population, the severity of the sickle cell disease were not associated exclusively with the haplotypes or the concentration of HbF; other polymorphisms in the cluster of  $\beta$  globin could be interfering in the development of the disease. Historical registers demonstrate that Africans who had been brought to Paraná in the XVIII and XIX centuries were of the ethnic group Bantu, from the region of the Republic of Central Africa. In spite of the low number of slaves in relation to other states of Brazil, there were great concentration of them in the regions of Antonina and Castro. The predominance of the haplotype CAR in Paraná is in accordance with the historical events. The haplotypes of  $\beta$  thalassemia as much as of HbC are more associated with haplotypes CAR of HbS, which suggests inner miscegenation between the HbS, HbC and the  $\beta$  thalassemia.

**Keywords:** Haplotypes. Sickle cell disease. Clinical evolution. State of Paraná. Brazil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CADEIAS GLOBÍNICAS DA HEMOGLOBINA A.....	23
FIGURA 2 - <i>CLUSTER</i> OU GRUPAMENTO DO GENE DA GLOBINA $\beta$ E RESPECTIVAS SÍNTESES DE HEMOGLOBINAS .....	25
FIGURA 3 - ALTERAÇÃO NA MORFOLOGIA DA HEMÁCIA COM A Hb POLIMERIZADA .....	28
FIGURA 4 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) A PARTIR DA L- ARGININA.....	29
FIGURA 5 - REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ERO A PARTIR DE O <sub>2</sub> .....	32
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA $\beta^S$ NA ÁFRICA.....	49
FIGURA 7 - GRUPAMENTO DO GENE DA GLOBINA $\beta$ , POLIMORFISMOS, HAPLÓTIPOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	50
FIGURA 8 - GRUPAMENTO DO GENE DA GLOBINA $\beta$ ANALISADO POR LEE <i>et al.</i> , 2002.....	57
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME GENOTIPADOS E AVALIADOS QUANTO À EVOLUÇÃO CLÍNICA .....	75
FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO 5' $\gamma^G$ .....	84
FIGURA 11 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO $\gamma^G$ .....	85
FIGURA 12 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO $\gamma^A$ .....	86
FIGURA 13 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO $\phi\beta$ .....	87
FIGURA 14 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO 3' $\phi\beta$ .....	88
FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO 5' $\beta$ .....	89

FIGURA 16 -ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO $\epsilon$ .....	90
FIGURA 17 -ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO $\beta$ .....	91
FIGURA 18 -ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO 3' $\beta$ .....	92
FIGURA 19 -DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA HbS NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE.....	101
FIGURA 20 -DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA DOENÇA S- TALASSEMIA $\beta$ NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE.....	102
FIGURA 21 -DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA DOENÇA DA HbSC NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE .....	103
FIGURA 22 -ORIGEM DA HbS NO ESTADO DO PARANÁ.....	114

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS DOENÇAS FALCIFORMES SS, S-TALASSEMIA $\beta^0$ E HbS/PHHF.....	46
QUADRO 2 - DEFINIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA $\beta^S$ , SEGUNDO RECONHECIMENTO PELAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	51
QUADRO 3 - GENÓTIPOS E FENÓTIPOS DA S-TALASSEMIA $\beta$ .....	56
QUADRO 4 - HAPLÓTIPOS DA TALASSEMIA $\beta$ .....	58
QUADRO 5 - HAPLÓTIPOS DA GLOBINA $\beta^C$ .....	60
QUADRO 6 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GRUPAMENTOS DA GLOBINA $\beta$ .....	79
QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DO <i>MIX</i> PARA PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES 5' $\gamma^G$ , $\gamma^G$ , $\gamma^A$ , $\phi\beta$ , 3' $\phi\beta$ , 5' $\beta$ DO GRUPAMENTO DA GLOBINA $\beta$ .....	81
QUADRO 8 - COMPOSIÇÃO DO <i>MIX</i> PARA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES $\epsilon$ , $\beta$ e 3' $\beta$ DO GRUPAMENTO DA GLOBINA $\beta$ ....	82
QUADRO 9 - PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	82
QUADRO 10 - <i>MIX</i> DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA DIGESTÃO ENZIMÁTICA SOBRE O PRODUTO DA PCR.....	82
QUADRO 11 - HAPLÓTIPOS DA HbS NA ANEMIA FALCIFORME- BRASIL.....	122
QUADRO 12 - HAPLÓTIPOS DA HbC NA DOENÇA SC - BRASIL.....	127

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME A IDADE.....	94
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS POR SEXO .....	95
TABELA 3 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES SS .....	96
TABELA 4 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES S- TALASSEMIA $\beta$ .....	96
TABELA 5 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES SC .....	97
TABELA 6 - FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS .....	98
TABELA 7 - FREQUÊNCIA RELATIVA DOS HAPLÓTIPOS .....	99
TABELA 8 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DE ACORDO COM O TIPO DE DOENÇA FALCIFORME, ENCONTRADAS EM CRIANÇAS ATÉ 3 ANOS DE IDADE E COM MAIS DE 3 ANOS, EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CRIANÇAS NAS RESPECTIVAS FAIXAS ETÁRIAS.....	105
TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES COM SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS.....	106
TABELA 10 -DISTRIBUIÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE ACORDO COM GÊNERO, GRUPO ETÁRIO E TIPO DE DOENÇA FALCIFORME.....	108
TABELA 11 -DISTRIBUIÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS DE HbS .....	109
TABELA 12 -PERFIL GENOTÍPICO DO PACIENTE n.º 19.....	119
TABELA 13 -COMPARAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS S-TALASSEMIA $\beta$ DO PR E PE .....	123
TABELA 14 -COMPARAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS DA DOENÇA SC NOS ESTADOS DO PR E SP.....	126
TABELA 15 -COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE HbF NOS GENÓTIPOS SS NO PARANÁ DO PRESENTE ESTUDO E RIO DE JANEIRO .....	130
TABELA 16 -COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE HbF ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS SS, NO ESTADO DO PARANÁ.....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	- Anemia falciforme
Atp	- Atípico
asp	- Asparagina
AVC	- Acidente vascular cerebral
BEN	- Haplótipo Benin
CAR	- Haplótipo da República Centro Africana ou Bantu
CAM	- Haplótipo Camarões
CEP	- Comitê de Ética
CEPE	- Centro de Pesquisas
CHCM	- Concentração de hemoglobina corpuscular média
CSSCD	- Estudo de Cooperação das Doenças Falciformes
DF	- Doença falciforme
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido etileno diamino tetracético
FEPE	- Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
Hb	- Hemoglobina
HbA	- Hemoglobina normal
HBB	- Gene da globina beta
HbC	- Hemoglobina C
HbF	- Hemoglobina fetal
HC	- Hospital de Clínicas
HCM	- Concentração de hemoglobina média
HEMEPAR	- Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do PR
HU	- Hidroxiuréia
IMC	- Índice de massa corporal
ISC	- Células irreversivelmente falcizadas
K <sup>+</sup>	- Potássio ionizado
Kb	- Kilobases
leu	- Leucina
mOsmol/L	- Miliosmol / litro



NO	- Óxido nítrico
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
phe	- Fenilalanina
pK	- Constante de ionização
pO <sub>2</sub>	- Pressão de oxigênio
RFLP	- Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
SEN	- Haplótipo Senegal
SRTN	- Serviço de referência em triagem neonatal
STA	- Síndrome torácica aguda
TAE	- Tampão tris-acetato-EDTA
$\alpha^{\text{thal}}$	- Talassemia- $\alpha$
TBE	- Tampão tris-borato-EDTA
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TER	- Treonina
tyr	- Tirosina
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VCM	- Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	21
1.2	OBJETIVOS .....	22
1.2.1	Objetivo Geral.....	22
1.2.2	Objetivos Específicos .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1	ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS.....	22
2.1.1	Estrutura dos Genes da Hemoglobina .....	22
2.2	ANEMIA FALCIFORME .....	26
2.2.1	Histórico e Origem da Anemia Falciforme .....	26
2.2.2	Fisiopatologia .....	27
2.2.2.1	Polimerização da HbS .....	27
2.2.2.2	Efeito do Óxido Nítrico e o Estado de Hipercoagulabilidade na Doença Falciforme.....	29
2.2.2.3	Estresse Oxidativo.....	32
2.2.3	Classificação Clínica das Doenças Falciformes .....	33
2.3	SINAIS E SINTOMAS.....	36
2.3.1	Complicações das Doenças Falciformes.....	36
2.3.1.1	Vaso Oclusão .....	37
2.3.1.2	Crises Dolorosas .....	38
2.3.1.3	Síndrome Torácica Aguda (STA).....	39
2.3.1.4	Sequestro Esplênico.....	40
2.3.1.5	Acidente Vascular Cerebral (AVC) .....	41
2.3.2	Outras Manifestações Clínicas (Hipertensão Pulmonar, Úlceras de Perna, Priapismo .....	42
2.4	CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME.....	43
2.5	SÍNDROME DA PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA HEMOGLOBINA FETAL FALCIFORME (HbS/PHHF) E A HbF COMO MODULADORA GENÉTICA NA DOENÇA FALCIFORME .....	44

2.6	HIDROXIURÉIA: A INIBIÇÃO QUÍMICA DO PROCESSO DE POLIMERIZAÇÃO DA HbS .....	47
2.7	HAPLÓTIPOS DA HbS.....	48
2.7.1	Características Geográficas e Moleculares dos Haplótipos da HbS.....	48
2.7.2	Identificação Molecular e Características Clínico-Laboratoriais dos Haplótipos da HbS.....	50
2.7.2.1	Haplótipos CAR (Bantu) e BENIN.....	51
2.7.2.2	Haplótipo SENEGAL (SEN).....	52
2.7.2.3	Haplótipo CAMARÕES (CAM).....	53
2.7.2.4	Haplótipo ÁRABE-INDIANO ou ASIÁTICO.....	54
2.7.2.5	Haplótipo Atípico.....	55
2.8	INTERAÇÃO S-TALASSEMIA $\beta$ E HAPLÓTIPOS DA TALASSEMIA $\beta$ .....	55
2.9	DOENÇA DA HEMOGLOBINA SC E HAPLÓTIPOS DA HbC .....	59
2.10	POLIMORFISMOS NO GRUPAMENTO DA GLOBINA $\beta$ E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	61
2.11	A BIOLOGIA MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DA HbS.....	63
2.11.1	Amplificação do DNA.....	64
2.11.2	Enzimas de Restrição.....	67
2.11.3	Identificação e Leitura do DNA .....	68
2.11.4	Técnica PCR - RFLP .....	69
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO .....	71
3.2	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	71
3.3	POPULAÇÃO FONTE .....	71
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	71
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	72
3.6	POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	72
3.7	AMOSTRA E TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM.....	72
3.8	VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	73
3.9	PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....	74
3.10	TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS .....	76

3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	76
3.12	ÉTICA EM PESQUISA .....	77
3.13	MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA .....	77
3.14	FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS .....	78
3.15	TÉCNICAS LABORATORIAIS - DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA $\beta^S$ , GLOBINA $\beta^C$ , S-TALASSEMIA $\beta$ .....	78
4	<b>RESULTADOS</b> .....	94
4.1	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO SEXO E IDADE.....	94
4.2	DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME O SEXO.....	94
4.3	FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NAS DF: SS, S-TALASSEMIA $\beta$ E NA DOENÇA SC .....	96
4.4	FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ .....	97
4.5	FREQUÊNCIA RELATIVA DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ .....	99
4.6	DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ .....	99
4.7	HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES E EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	104
4.7.1	Distribuição dos Eventos Clínicos, de Acordo com a Idade e o Tipo de Doença Falciforme.....	104
4.7.2	Distribuição dos Eventos Clínicos, de Acordo com os Genótipos Falciformes .....	106
4.8	ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NAS DOENÇAS FALCIFORMES E SUA RELAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS .....	107
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	110
5.1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ .....	110
5.2	ORIGEM ANTROPOLÓGICA DOS HAPLÓTIPOS DA HbS NAS DOENÇAS FALCIFORMES .....	111
5.2.1	Na Anemia Falciforme .....	111
5.2.2	Na Doença SC e S-talassemia $\beta$ .....	114

5.3	ASPECTOS MOLECULARES DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES .....	117
5.3.1	Frequência dos Haplótipos da HbS no Brasil .....	119
5.3.2	Frequência dos Haplótipos da S-talassemia $\beta$ no Brasil .....	123
5.3.3	Frequência dos Haplótipos da Doença SC no Brasil .....	125
5.4	HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICA .....	128
6	CONCLUSÕES .....	138
	REFERÊNCIAS .....	139
	APÊNDICES .....	154
	ANEXOS .....	159

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças hereditárias, as hemoglobinopatias são as mais comuns na espécie humana, provavelmente devido à vantagem na sobrevivência conferida pelo heterozigoto contra a malária, como no caso da doença falciforme (DAVIES; ROBERTS-HAREWOOD, 1997). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, nascem anualmente mais de 332.000 crianças afetadas por alguma hemoglobinopatia. Aproximadamente 275.000 destas possuem doença falciforme, necessitando diagnóstico precoce e profilaxia; 56.000 nascem com talassemia *major*, sendo que 30.000 destas necessitarão de transfusões regulares para sobreviver e 5.500 morrerão no período peri-natal pela presença de talassemia alfa *major* (WHO, 2008).

A doença falciforme (DF) abrange diferentes genótipos que incluem a anemia falciforme, que apresenta a HbS em homozigose (SS), além dos duplos heterozigotos para os genes das hemoglobinas S e C e os genes da HbS-talassemia  $\beta$  (STEINBERG, 2005).

A anemia falciforme apresenta quadro clínico caracterizado por anemia hemolítica de desenvolvimento e gravidade bastante variáveis (CAMERON *et al.*, 1983) e evolução não previsível, sendo a mais grave dentre as doenças falciformes (QUINN *et al.*, 2007). É uma condição genética com fisiopatologia multifacetada pois envolve alterações nas hemácias, processos vaso-oclusivos, estado de inflamação crônica, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Como consequência, ocorre a diminuição no fluxo sanguíneo e obstrução na microcirculação, que irão provocar as diversas complicações clínicas (CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). O estudo das associações genéticas que procura relacionar os polimorfismos dos genes com os haplótipos de doenças pode ser eficiente ferramenta para prever a probabilidade de ocorrência de complicações e permitir tratamento diferenciado com mais qualidade para o paciente (STEINBERG, 2005).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Pressupõe-se que a variabilidade clínica entre pacientes com diagnóstico de doença falciforme possa ser causada por diversos fatores, que ainda não são completamente conhecidos.

A análise dos antecedentes históricos referentes à apresentação clínica de pacientes com DF revela que crianças morriam durante o primeiro episódio de infecção sugerindo que apresentavam uma forma grave da doença, em muitos casos somente diagnosticada naquele momento; além disso, as causas que levavam ao quadro de sepse não podiam ser identificadas em tempo hábil para intervenção terapêutica de sucesso. Por outro lado, não se explicava como outros pacientes, com diagnóstico semelhante, sobreviviam a acidentes vasculares encefálicos e episódios de infecções de repetição, até a idade de 70 anos ou mais (STEINBERG, 2005). Na tentativa de identificação de variáveis que pudessem prever a evolução clínica, foram cogitadas as de natureza intrínseca e as extrínsecas, porém nenhuma delas isoladamente apresentava poder preditivo de relevância (STEINBERG, HEBBEL, 1983; ELION *et al.*, 1992. INATI *et al.*, 2003).

Sabe-se que pacientes com diferenças em seus haplótipos de HbS diferem clinicamente; contudo, essa observação foi constatada para os grupos de pacientes de populações homogêneas originárias de uma mesma região (INATI *et al.*, 2003; NDUGWA *et al.*, 2012).

Não se conhece qual o tipo de haplótipo prevalente no estado do Paraná e se há associação com a heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes dessa região geográfica.

O presente trabalho se justifica pela possibilidade de fatores genéticos ligados à HbS, especificamente os haplótipos da globina  $\beta^S$  estarem influenciando nas manifestações clínicas dos pacientes.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Conhecer a distribuição dos haplótipos de HbS dos pacientes com doença falciforme: anemia falciforme, interação S-talassemia  $\beta$  e doença SC, atendidos na rede pública do estado do Paraná.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o haplótipo da HbS mais frequente no estado do Paraná.
- 2) Associar os haplótipos encontrados com os eventos históricos.
- 3) Verificar a possível associação do haplótipo da HbS identificado com a gravidade clínica
- 4) Identificar diferenças na associação da HbS com a talassemia  $\beta$  ou com a HbC, nas manifestações clínicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS

#### 2.1.1 Estrutura dos Genes da Hemoglobina

O genoma haplóide contém aproximadamente  $3 \times 10^9$  pares de bases e este material genético está distribuído nos 23 pares de cromossomos. O *cluster* ou grupamento do gene da globina  $\beta$  está localizado no cromossomo 11 (região 11p 15.5) e é composto por 5 genes arranjados na ordem: 5'-  $\epsilon$ ,  $-\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\phi\beta$ ,  $-\delta$ - $\beta$  -3'. (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CHRISTAKI, 2007; BAHADIR *et al.*, 2009) (Figura 2).



Além do gene da globina  $\beta$ , outros genes que expressam as globinas  $\alpha$  e  $\gamma$ , determinam a estrutura da hemoglobina. Os genes  $\alpha$  codificam para polipeptídeos idênticos, mas as cadeias  $\gamma$  formam produtos que diferem em um único aminoácido; a cadeia globínica, com glicina na posição 136 é conhecida por  $\gamma^G$  e a com alanina é conhecida por  $\gamma^A$ . No braço curto do cromossomo 16, está o gene que codifica a cadeia  $\zeta$  (ZETA) e 2 genes que codificam a globina  $\alpha$  (NAGEL, IN: NATHAN., OSKI'S, 2003).

Cada molécula da hemoglobina é composta de 4 subunidades, formando um complexo de duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  (ALBERTS *et al.*, 2006) (Figura 1). As quatro cadeias são dobradas e se ajustam para formar um tetrâmero globular (WEATHERALL *et al.*, 2001), com peso molecular de aproximadamente 64.500 Da, representado por  $\alpha_2\beta_2$  que interagem, permitindo alteração alostérica cooperativa na molécula que possibilita que a hemoglobina absorva e libere o oxigênio mais eficientemente do que se tivesse uma única cadeia (ALBERTS *et al.*, 2006). A cadeia de globina  $\alpha$  possui 141 aminoácidos e a cadeia  $\beta$  possui 146, sendo, portanto as 2 cadeias semelhantes tanto na sequência de aminoácidos (estrutura primária) quanto na configuração tridimensional (estrutura terciária). Como as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são codificadas por genes em loci separados, uma mutação de ponto afeta uma cadeia ou a outra, mas não ambas (THOMPSON; THOMPSON, 2002).

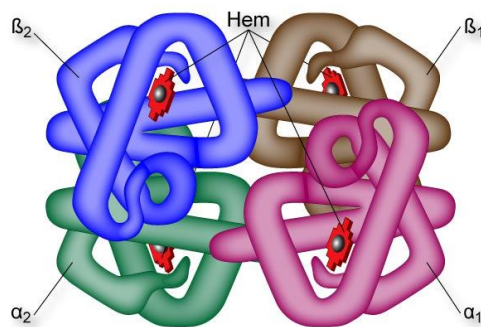


FIGURA 1 - CADEIAS GLOBÍNICAS DA HEMOGLOBINA A  
 FONTE:Disponível em: [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com)  
 Acesso em: 21 fev. 2015

Além da hemoglobina A (HbA) que corresponde a 97% da hemoglobina no adulto, outras cinco hemoglobinas humanas normais possuem estrutura tetramérica semelhante a ela, formada por 2 cadeias  $\alpha$ , ou similares a  $\alpha$ , e 2 cadeias não- $\alpha$ .

Os genes nos grupamentos  $\alpha$  e  $\beta$  estão dispostos na mesma orientação transcricional e na mesma ordem sequencial na qual são expressos durante o desenvolvimento.

A expressão sequencial dos vários genes de globina durante o desenvolvimento é chamada de mudança ou *switch* de globina; é um exemplo clássico da regulação ordenada da expressão gênica. No indivíduo sadio, existe produção equimolar de cadeias de globinas similares  $\alpha$  e  $\beta$ . Entretanto, as mudanças temporárias da síntese de globina são acompanhadas de alterações no sítio principal da eritropoese.

A síntese das hemoglobinas embrionárias Gower 1 ( $\zeta_2 \epsilon_2$ ); Gower 2 ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2 \gamma_2$ ), ocorre no saco vitelínico da 3.<sup>a</sup> à 8.<sup>a</sup> semana de gestação e por volta da 5.<sup>a</sup> semana, o sítio principal da hematopoese move-se do saco vitelínico para o fígado fetal. As cadeias  $\alpha_2 \gamma_2$  tiveram origem na evolução dos mamíferos, do gene da cadeia  $\beta$ , que aparentemente sofreu duplicação e mutações para dar origem a uma segunda cadeia tipo  $\beta$ , que é especificamente sintetizada no feto (Figura 2) (WEATHERALL et al., 2001).

A molécula de hemoglobina resultante possui maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina do adulto, auxiliando na transferência do oxigênio da mãe para o feto. Este novo gene posteriormente, sofreu novas mutações e mais uma vez duplicou-se para produzir dois novos genes  $\epsilon$ , que são produzidos prioritariamente em relação à cadeia  $\gamma$  no feto, para formar as cadeias  $\alpha_2 \epsilon_2$  e subsequentemente as cadeias  $\alpha_2 \gamma_2$  (ALBERTS et al., 2006; SANKARAN; ORKIN, 2013).

A HbF ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) é a hemoglobina predominante durante a vida fetal e no recém-nascido, constituindo em torno de 70% da hemoglobina total ao nascimento e diminuindo para cerca de 1% na vida adulta, onde predominam as hemoglobinas A ( $\alpha_2 \beta_2$ ) e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ) (THOMPSON; THOMPSON, 2002; PANDEY et al., 2012) (Figura 2).

Aceita-se que a partir de um gene da cadeia  $\beta$  adulta originou-se um gene de globina  $\delta$  e, como consequência, uma forma minoritária de hemoglobina ( $\alpha_2\delta_2$ ), que é encontrada apenas nos primatas adultos (ALBERTS *et al.*, 2006).

A síntese da cadeia  $\delta$  continua após o nascimento, porém contribui com apenas 2% da hemoglobina adulta, podendo variar dentro da normalidade em até 2,4% (NAGEL, 2003).

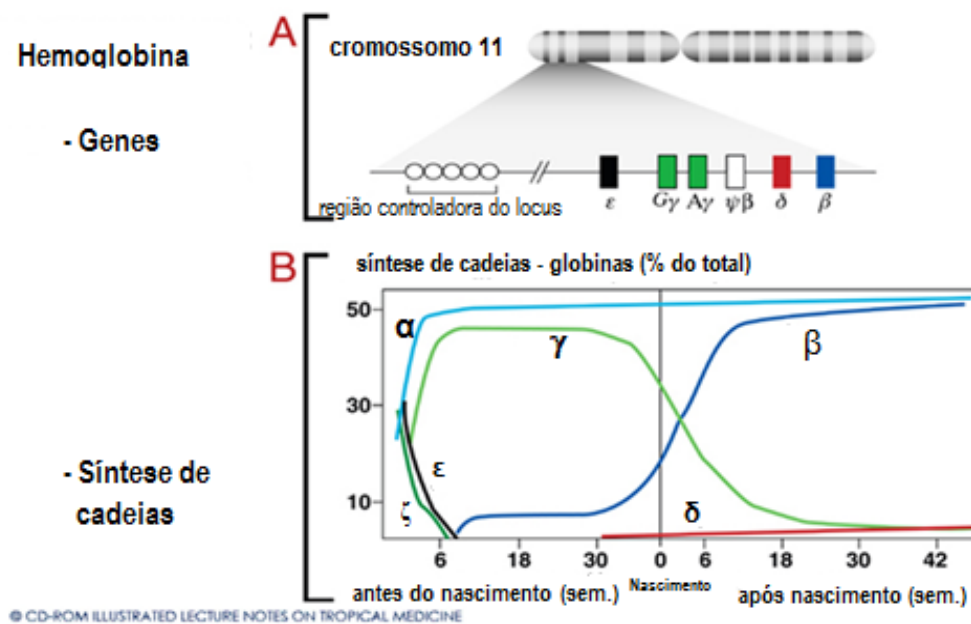


Figura 2 - *Cluster* ou grupamento do gene da globina  $\beta$  e respectivas sínteses de hemoglobinas.

Fonte: Illustrated lectures notes on tropical medicine. Acesso:19/09/2015

Existem sequências de DNA de globinas duplicadas nos agrupamentos gênicos de globinas  $\alpha$  e  $\beta$  que são genes não funcionais ou pseudogenes, os quais possuem íntima homologia com os genes funcionais, porém por mutações foram impedidos de se expressarem. O pseudogene  $\phi\beta$  está situado no *cluster* da globina  $\beta$  entre os genes  $\gamma^A$  e  $\delta$  (WEATHERALL *et al.*, 2001; THOMPSON; THOMPSON, 2002; ALBERTS *et al.*, 2006).

## 2.2 ANEMIA FALCIFORME

### 2.2.1 Histórico e Origem da Anemia Falciforme

Em 1910, Dr. James Herrick publicou um artigo descrevendo os sintomas da anemia falciforme, em um paciente negro jovem, estudante de Chicago, nascido em Granada, no oeste da Índia. É o primeiro relato onde se descrevem os sinais e sintomas característicos da anemia falciforme além da presença de hemácias em forma de foice ou meia lua (HERRICK, 2001).

Em 1917, Emmel descreveu o fenômeno da falcização *in vitro*, em membros de uma família, sugerindo a base genética da doença (DESAI; DHANANI, 2004).

Em 1949, Linus Pauling e seus colaboradores definiram a anemia falciforme como "doença molecular" e mostraram que a proteína da hemoglobina possuía uma alteração química, que se manifestava com diferença de carga na proteína como um todo, percebida na eletroforese por Tiselius. Não se sabia se esta alteração era causada por um aminoácido, dois, três ou mais (PAULING *et al.*, 1949; INGRAM, 2004).

Coube a Ingram relatar que a HbS diferia da hemoglobina normal em apenas um aminoácido: o ácido glutâmico da hemoglobina normal era substituído pela valina (INGRAM, 1957).

Kan e Dozy, em 1978, foram os primeiros a descrever o método de diagnóstico da anemia falciforme usando DNA dos indivíduos afetados baseados na ligação do alelo do gene da globina  $\beta$  com fragmentos de restrição de diferentes comprimentos. Porém, a técnica era considerada desafiadora pois necessitava de grande quantidade de DNA e era demorada (WU *et al.*, 1989).

Em 1985, a técnica da PCR foi modificada, amplificando em menor tempo e com menor quantidade de DNA alvo (SAIKI *et al.*, 1985).

Em 1987, citava-se que uma das causas da heterogeneidade na manifestação da doença era a relação do gene da HbS a três diferentes arranjos de genes ligados e suas sequências. São as primeiras teorias sobre o surgimento e expansão da mutação da variante da HbS em regiões distintas da África, caracterizando 3 *clusters* ou grupamentos de haplótipos do gene  $\beta$  ligados à variante da HbS (PAGNIER *et al.*, 1984; NAGEL *et al.*, 1987).

## 2.2.2 Fisiopatologia

### 2.2.2.1 Polimerização da HbS

A HbS ocorre devido a uma única substituição de nucleotídeo. No sexto códon da globina  $\beta$ , ocorre a troca de adenina por timina codificando uma valina (hidrofóbica) no lugar do ácido glutâmico (hidrofílico) (GAG→GTG: Glu6Val) (THOMPSON; THOMPSON, 2002), localizando-se dentro do grupamento de genes também conhecido por *cluster* da globina  $\beta$  no braço curto do cromossomo 11 (INATI *et al.*; 2003).

A partir da mutação que gera a HbS, o processo fisiopatológico se inicia pela polimerização da HbS, que resulta na formação de cristais líquidos conhecidos por tactóides, levando à falcização da hemácia (HEBBEL, 1991; WEATHERALL *et al.*, 2001).

Os polímeros ocorrem pela formação de um gel de grande peso molecular, que fica em equilíbrio com a solução monomérica da hemoglobina. Estes monômeros são estáveis em solução sob determinada concentração da HbS, pH, força iônica e temperatura. Mas qualquer pequena modificação em uma destas variáveis provoca rápida alteração para a forma gel da HbS. Esta modificação aumenta a sua viscosidade gerando alterações na morfologia celular, com consequente obstrução do fluxo sanguíneo e infarto ou obstrução dos vasos sanguíneos, que são as características marcantes das doenças falciformes. Esta transição parece ocorrer em duas etapas: a primeira é a fase *lag* que corresponde à formação de polímero de tamanho crítico. Havendo este polímero inicial, a reação ocorre mais rapidamente e resulta na formação de polímeros de alto peso molecular, com as fibras densamente alinhadas. Esta etapa é extremamente sensível a mudanças de temperatura e pH.

Outros estudos mostraram que a cinética da polimerização da HbS está baseada no mecanismo da dupla nucleação. O processo de gelificação inicia-se pela nucleação homogênea onde moléculas de HbS unitárias se agregam. Estes aglomerados são termodinamicamente instáveis e após uma quantidade crítica destes formando um núcleo crítico, novas moléculas são atraídas, produzindo um agregado estável, que são os polímeros. Numa segunda fase, forma-se uma nucleação heterogênea sobre o polímero pré-existente. À medida que este processo avança mais superfícies são criadas e a reação se torna auto-catalítica (WEATHERALL *et al.*, 2001).

A HbS polimeriza-se em estado de desoxigenação pela formação de fibras intracelulares que provocam a deformidade da célula falciforme (GLADWIN; VICHINSKY, 2008). Quando a desoxigenação é rápida e múltipla, eventos independentes de polimerização resultam em texturas granulares que não irão modificar o formato discóide da hemácia. Mas, quando as células SS são desoxigenadas lenta ou parcialmente, forma-se um único agregado de moléculas desoxigenadas (HEBBEL, 1991), modificando a hemácia da forma bicôncava para a forma em foice.

A microscopia eletrônica das hemácias falcizadas mostra feixes longos e finos de fibras de HbS, que tendem a correr paralelas ao eixo longitudinal da célula, responsável pela morfologia anormal em forma de foice (WEATHERALL *et al.*, 2001; FRENETTE; ATWEH, 2007) (Figura 3).

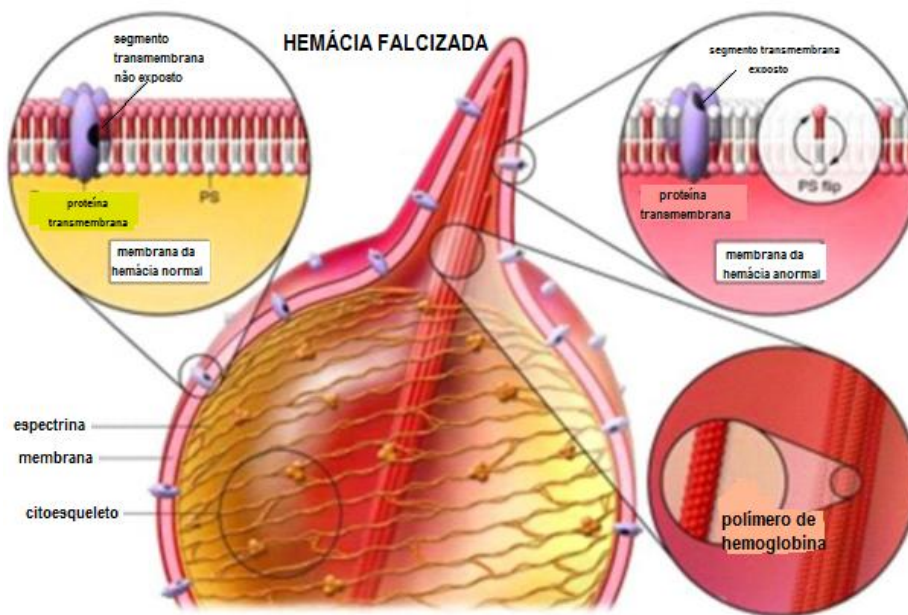


FIGURA 3 - ALTERAÇÃO NA MORFOLOGIA DA HEMÁCIA COM A Hb POLIMERIZADA  
FONTE: Frenette e Atweh (2007)

As projeções das fibras de HbS que causam as alterações na forma da hemácia têm papel fundamental na modificação da estrutura e função da membrana da hemácia falciforme, mediada em parte pelo estresse oxidativo (HEBBEL, 1991). Esta deformação diminui a flexibilidade da célula, causando o seu trânsito turbulento através da microcirculação, que é a base das manifestações vaso-oclusivas da doença falciforme. Estas alterações estruturais do glóbulo vermelho também são causa da diminuição na sua sobrevivência provocando anemia hemolítica crônica.

Diferentes modelos têm sido propostos, com fibras torcidas em configuração helicoidal, formando feixes ocos, compostos por 6, 8 ou 14 fibras com diâmetros externos de 170 a 220 Angstrom.

A estabilização destas estruturas depende das cadeias globínicas individualmente. Por meio das técnicas de difração de raio X, identificou-se o ponto de contato mais importante entre duas moléculas, que ocorre na posição  $\beta 6$  val de uma molécula e a cavidade hidrofóbica receptora da unidade  $\beta$  da outra molécula, formada pela Leu88 e Phe85, que estão envoltas pelos resíduos hidrofílicos de Asp73, Thr84, Thr87 (WEATHERALL *et al.*, 2001).

#### 2.2.2.2. Efeito do Óxido Nítrico e o Estado de Hipercoagulabilidade na Doença Falciforme

O óxido nítrico (NO) é um gás com meia vida de segundos, produzido pelas células endoteliais sob a ação da NO-sintetase (NOS), sobre a L-arginina (DE FRANCESCHINI; CORROCHER, 2004; STUART; NAGEL; 2004; MACK; KATO, 2006; CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009) (Figura 4).

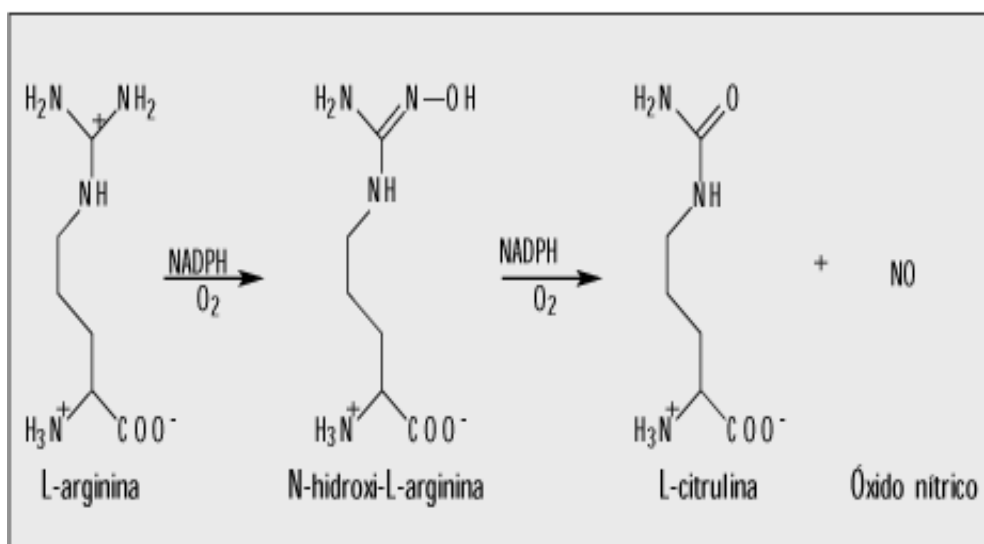


Figura 4 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) A PARTIR DA L- ARGININA

Fonte: [hipertensao2012.blogspot.com](http://hipertensao2012.blogspot.com). acesso: 03.10.2015

É altamente reativo (THOMAS *et al.*, 2013) e uma vez liberado do endotélio, tem a função de regular a vasodilatação e aumentar o fluxo sanguíneo no músculo. Além disso, inibe a ativação e agregação plaquetária e também a expressão de fatores de adesão molecular, reduzindo os níveis de superóxidos (GLADWIN; VICHINSKY, 2008; KATO, 2015), diminuindo a expressão das moléculas de adesão e dos leucócitos ao endotélio. É um potente vasodilatador e facilita a manutenção do tônus basal (FRANCESCHINI; CORROCHER, 2004, STUART, NAGEL; 2004; MACK; KATO, 2006; CONRAM *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2013).

A sua atividade vasodilatadora só é possível porque a maioria da hemoglobina está compartimentada dentro da hemácia. Na hemólise, a hemoglobina livre no plasma atua como um potente inibidor do óxido nítrico, formando barreiras que impedem sua difusão, causando disfunção célula-endotélio e consequente resistência ao NO (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

Na doença falciforme, os níveis sanguíneos de arginina estão diminuídos, consequentemente os níveis de NO estão suprimidos, prejudicando o fluxo sanguíneo principalmente durante as crises vaso-oclusivas e na síndrome torácica aguda. Estes níveis variam inversamente com os sintomas dolorosos (MACK; KATO, 2006; CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). Além da diminuição da arginina no sangue, há o consumo de NO pelas espécies reativas do oxigênio (EROS), que são produzidas pelas membranas da hemácia, provocado pelos repetidos movimentos de falcização e normalização, que resultam na exposição das proteínas da membrana.

Durante a hemólise, se a relação entre os níveis da arginina (substrato) e um dos seus produtos, a ornitina estiver baixa, haverá risco aumentado de desenvolvimento de hipertensão pulmonar com morte (MACK; KATO, 2006; GLADWIN; VICHINSKY, 2008; CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). A hemólise também está associada à formação de microvesículas na membrana da hemácia, expondo a fosfatidilserina (PS), que se localiza na camada interna da membrana celular e é um ativador de fator tissular. A exposição anormal da PS ocorre pelos vários eventos de deformação e normalização na forma da hemácia provocados pela constante polimerização e despolimerização da HbS que irão formar as espículas ou microvesículas (FRENETTE; ATWEH, 2007; TANTAWY *et al.*, 2015).



Durante a apoptose, a PS identifica as células nucleadas para a remoção e libera os complexos enzimáticos envolvidos no processo da coagulação e anticoagulação (ATAGA; KEY, 2007). O aumento de dímero-D, que é um marcador da disfunção endotelial, sinaliza a fibrinólise e ativação da coagulação e aumento da concentração de fator de von Willebrand no organismo. Além de inibir a adesão, agregação e recrutamento das plaquetas, o NO inibe a migração e crescimento de células musculares lisas; também regula algumas interações vaso-plaquetárias e limita a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade aterogênicas. Por isso a depleção do NO, bem como da arginina, favorece a ativação das plaquetas, contribuindo para um estado de hipercoagulabilidade nas doenças hemolíticas (GLADWIN; VICHINSKY, 2008; TANTAWY *et al.*, 2015).

Na DF, observa-se hipercoagulabilidade pois vários sistemas hemostáticos, que, tanto no estado normal (fora da crise) como durante as crises de vaso-oclusão, estão alterados levando à ativação do sistema de coagulação, das plaquetas, geração de trombina e ocorrência de trombose. A causa deste estado hipercoagulável é multifatorial, citando-se baixos níveis de proteína C, proteína S e antitrombina III no plasma; níveis elevados de complexos trombina-antitrombina; de fragmentos 1 + 2 de protrombina (F1+2 no plasma), e de complexos de dímeros D, que estão em concentração plasmática aumentada, nos momentos de crise de dor e também fora dela (RAHIMI; PARSIAN, 2011; ATAGA *et al.*, 2012). Além disso, como a concentração de anticorpos anti-fosfolípidos circulantes está aumentada, ocorre ativação das plaquetas durante a crise vaso-oclusiva, exposição anormal da PS e aderência da hemácia falcizada ao endotélio vascular; redução dos níveis de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão dos fatores tissulares. Essas anormalidades aumentam o risco para trombose (RAHIMI; PARSIAN, 2011).

Os parâmetros laboratoriais da hemostasia como função plaquetária, mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes e o sistema fibrinolítico estão alterados. Os pacientes com DF apresentam níveis de trombina aumentados, ativação da fibrinólise, diminuição nos níveis das proteínas anticoagulantes, contagem de plaquetas aumentada, fator tecidual e outros elementos celulares ativado, caracterizando o estado de hipercoagulabilidade (STYPULKOWSKI; MANFREDINI, 2010; TANTAWY *et al.*, 2015).

### 2.2.2.3 Estresse Oxidativo

A molécula de oxigênio forma metabólitos altamente reativos como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ). Estes metabólitos oxigenados, quimicamente reduzidos, são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHIRICO; PIALOUX, 2012) (Figura 5).

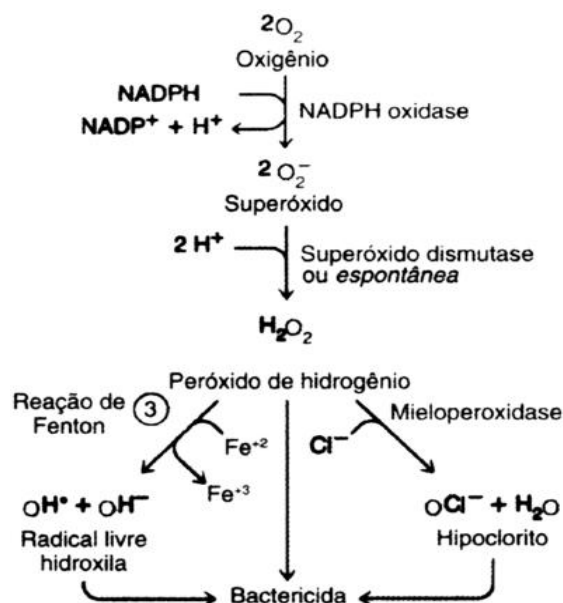


FIGURA 5. REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ERO A PARTIR DE  $O_2$ .

FONTE: <http://biobioradicaislivres.blogspot.com.br/p/quem-somos.html> acesso 26.09.2015

Quando o átomo principal é o nitrogênio, formam-se as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Tanto ERO quanto ERN estão implicados na produção de energia, nos processos de fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de produtos celulares fundamentais. Mas o seu excesso provoca danos como a peroxidação na membrana lipídica das células, agressões nas membranas e proteínas dos tecidos; nas enzimas, carboidratos e no DNA (BARREIROS; DAVI; DAVI, 2006).

As hemácias falciformes possuem concentrações aumentadas de ERO, provocadas pelo aumento da atividade de enzimas como a NADH oxidase na leucocitose e xantina oxidase endotelial. Vários fatores contribuem para provocar o estresse oxidativo intravascular. A HbS se auto-oxida na presença do oxigênio com produção de superóxido e radicais hidroxila; nos processos de isquemia-reperfusão na microcirculação podem ser produzidos radicais livres de oxigênio; na ausência da arginina, o NOS pode produzir superóxidos ao invés de NO (CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

Na DF, os níveis de antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas A, C e E e os antioxidantes enzimáticos como a glutathione peroxidase e o superóxido dismutase estão diminuídos, e o estresse oxidativo resultante provoca rigidez na membrana da hemácia com instabilidade mecânica, contribuindo para a hemólise, podendo ocorrer aumento das propriedades adesivas das hemácias, leucócitos, e plaquetas, que aliado à inativação do NO pelas ERO, demonstram importante papel no processo vaso-oclusivo (CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

No laboratório, o uso de flavonóides como a quercetina, rutina, miricetina e hesperidina encontrados em produtos naturais como frutas, chás e vinhos ajudam a inibir as ERO, tanto em hemácias de indivíduos sadios quanto nas de pacientes com DF (HENNEBERG *et al.*, 2013).

### **2.2.3 Classificação Clínica das Doenças Falciformes**

O termo DF abrange o estado em homozigose da HbS e aqueles onde pelo menos um gene falciforme está associado a outro de hemoglobina variante, como o que ocorre na doença SC (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007), nas interações da HbS com a talassemia  $\beta$ , incluindo a  $S\beta^0$  ou a  $S\beta^+$  ou ainda, interações com hemoglobinas variantes menos frequentes (DAVIES, ROBERTS-HAREWOOD, 1997; BALLAS *et al.*, 2010).

A interação S-talassemia  $\beta^+$  pode ser classificada em subtipos I, II e III, conforme a quantidade de HbA produzida. O tipo I é o defeito mais grave, com produção de 3 a 5% de HbA, sendo mais frequente na Índia; o tipo II produz de 8 a 14% de HbA mas ainda é de gravidade importante e ocorre na região mediterrânea e o tipo III produz de 18-25% de HbA, possui curso benigno e é o mais comum em pacientes de origem africana. A interação S-talassemia  $\beta^0$  resulta em ausência de síntese de HbA. Clinicamente, esta última se assemelha à anemia falciforme entretanto, todos os tipos da doença falciforme podem apresentar manifestações clínicas (DAVIES, ROBERTS-HAREWOOD, 1997; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007).

Portanto, o fenótipo da DF pode ser influenciado por fatores como o genótipo da doença - a homozigose para a HbS - anemia falciforme ou os genótipos compostos como a doença HbSC e interações da HbS com a talassemia  $\alpha$  ou  $\beta$ ; além dessas diferenças, pode haver influência dos haplótipos no *cluster* ou grupamento da globina  $\beta$  e da expressão da hemoglobina fetal (HbF) (MARCUS *et al.*, 1997; STEINBERG, 2005; SAMARAH.; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007; RAHIM.; KAEIKHAEI., MOHAMMAD, 2007; ZAGO, SILVA-PINTO, 2007).

Segundo Zago e Silva Pinto, 2007, os haplótipos podem interferir no processo da polimerização da HbS, na falcização e destruição da hemácia, provocando a sua hemólise. A coexistência da talassemia  $\alpha$  ( $\alpha^{\text{thal}}$ ) diminui o volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM), resultando em menor grau de hemólise, com consequente aumento de hemoglobina total o que propicia crises vaso-oclusivas e de dor com maior frequência (SALEH-GOHARI; MOHAMMADI-ANAIE, 2012). Além disso, a concentração total de hemoglobina, a reologia da hemácia, a porcentagem de células de adesão e a proporção de células densas também influenciam na variabilidade da manifestação clínica (MARCUS *et al.*, 1997).

Fatores ambientais e sócio econômicos extrínsecos ao paciente podem ou não interferir no desenvolvimento da doença (STEINBERG, HEBBEL, 1983; ELLISON; BAUCHNER, 2007; ZAGO; SILVA PINTO, 2007, TEWARI; REES, 2013). A adesão ao tratamento é um dos fatores não genéticos que pode influenciar na sua evolução (RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007). Para e Marcus *et al.* (1997), o gênero feminino teria melhor prognóstico devido a maior produção de HbF, por fatores hormonais, ou pela presença de genes localizados no cromossomo X. Outros agentes que estão implicados no processo da expressão da doença falciforme são os mediadores dos processos inflamatórios, lesões por agentes oxidantes como o óxido nítrico (NO), interação intercelular, fatores de coagulação sanguínea, processo de homeostase, fatores de crescimento, receptores de citocinas e reguladores transcricionais. Esses fatores ocorrem independentemente do processo de polimerização da HbS.

Com o advento da triagem neonatal, melhoria no sistema de saúde, educação continuada e profilaxia com penicilina, a morbi-mortalidade pela HbS tem diminuído expressivamente (STUART; NAGEL, 2004; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA.; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007). No Brasil, desde a sua implantação em 2001, os programas de triagem neonatal vêm contribuindo para o aconselhamento familiar, vacinação, distribuição de medicamentos e acesso a recursos médicos para o tratamento de complicações. Mas, a mortalidade por doenças falciformes ainda são significativas (LIMA et al., 2015; VIANA, 2015). Em dois estudos de coorte, realizados no Rio de Janeiro e Minas Gerais, 71,8% das mortes das crianças SS ocorreram antes dos 2 anos de idade, sendo as principais causas as infecções e sequestro esplênico e 23% das mortes ocorreram por outras causas. As características sócio-econômicas dos familiares também influenciam na tomada de medidas preventivas, na nutrição, no acesso a tratamentos médicos que irão refletir na sobrevivência destes pacientes (FERNANDES *et al*, 2010).

Nos EUA na década de 90, nos pacientes SS, a expectativa de vida era de 42 anos para os homens e 48 anos para as mulheres e nos pacientes SC, era de 60 para os homens e 68 anos para as mulheres (PLATT; BRAMBILLA, 1994). No século XXI, as causas mais frequentes de morte nos pacientes com doenças falciformes são as infecções, hipertensão pulmonar, falência renal e morte repentina de etiologia desconhecida. Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade em crianças é estimada ser tão baixa quanto 0,5-1,0 por 100.000 crianças nascidas vivas, em contraste com taxas mais elevadas em países em desenvolvimento como Benin, com taxas de mortalidade de 15,5/1.000 crianças nascidas vivas. Nestas, as causas mais comuns de morte são infecções, síndrome torácica aguda (STA) e acidente vascular cerebral (AVC) (NEVILLE, PANEPINTO, 2011).

## 2.3 SINAIS E SINTOMAS

A DF provoca significativa morbidade e mortalidade. Os sinais e sintomas incluem anemia crônica, dor torácica aguda, alterações neurológicas secundárias a acidentes vasculares encefálicos, propensão a infecções por disfunção esplênica, desidratação por disfunção renal, e crises de dor, entre outros.

Crianças com doenças falciformes apresentam importante diminuição na estatura, peso e IMC, além do atraso na maturação sexual em relação às crianças saudáveis. Nutrição inadequada, anormalidade nas funções endócrinas e em especial, aumento nas necessidades calóricas devido ao gasto energético elevado parecem ser as causas do déficit pômdero-estatural. Apesar da falta de evidência, alguns autores acreditam que o crescimento possa ser estimulado pelas transfusões crônicas, aumento da ingesta calórica ou o uso da hidroxiuréia (HU) (BALLAS *et al.*, 2010).

A mortalidade pediátrica ocorre primariamente devido a infecções bacterianas e AVC. Os pacientes adultos podem desenvolver vasculopatia progressiva, caracterizada por hipertensão sistêmica e pulmonar, disfunção endotelial e mudanças progressivas na camada íntima da musculatura lisa dos vasos sanguíneos. À medida que o paciente envelhece, degeneração progressiva pode ocorrer: insuficiência renal crônica, AVC hemorrágicos e não hemorrágicos, necrose avascular de ossos e hipertensão pulmonar, que é o mais prevalente dos sintomas (GLADWIN; VICHINSKY, 2008). As causas da mortalidade são mais inespecíficas, mas pacientes com mais sintomas podem apresentar mortalidade precoce (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007).

### 2.3.1 Complicações das Doenças Falciformes

Por ser doença inflamatória crônica, decorrente de diversos fatores que se interligam e retroalimentam, as DF cursam com um ciclo permanente de inflamação (ZAGO; SILVA PINTO, 2007).

As complicações são diversas, mas as crises de dor por vaso-occlusão e a STA são os dois eventos agudos mais frequentes (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

### 2.3.1.1 Vaso-Oclusão

A apresentação clínica da doença falciforme é o resultado da adesão das células falciformes ao endotélio vascular, resultando em pequenas vaso-occlusões bem como danos do endotélio e trombose vascular que podem ocorrer no cérebro, pulmões, abdome e circulação placentária (DAVIES; ROBERTS-HAREWOOD, 1997).

As crises vaso-oclusivas chamadas precoces são as que ocorrem durante os três primeiros anos de vida. Nesta faixa etária, predominam as dactilites e a síndrome torácica aguda (QUINN *et al.*, 2007). Os internamentos podem ocorrer por três causas principais: crises de dor sem dactilites, por dactilites e por STA. São as maiores causas de morbimortalidade, pois a oclusão dos vasos sanguíneos, pela formação de redes adesivas de hemácias e leucócitos na microcirculação, obstrui o fluxo sanguíneo provocando isquemia de órgãos causando intensa dor (STEINBERG; HEBBEL, 1983; STUART; NAGEL, 2004; GLADWIN; VICHINSKY, 2008). Além disso, desencadeia inflamação e danos ao endotélio, com ativação da cascata de coagulação, amplificando progressivamente os danos aos órgãos (JOHNSON, TELEN, 2008).

A oclusão microvascular ocorre predominantemente em regiões localizadas da medula óssea, causando necrose. Os mediadores da inflamação ativam as fibras nervosas aferentes, provocando dor. As áreas afetadas são os ossos longos, costelas, esterno, coluna torácica e pelve, geralmente com múltiplas áreas envolvidas. A oclusão microvascular do córtex e perióstio pode causar manifestações clínicas que sugerem osteomielite; quando ocorre nas veias mesentéricas afetando a mobilidade intestinal caracteriza crise abdominal podendo confundir com abdome agudo (STUART; NAGEL, 2004).

Alguns pacientes apresentam episódios de vaso-occlusão com muita frequência e morrem precocemente, enquanto outros apresentam poucos problemas e levam vida normal (QUINN *et al.*, 2007). Muitas das crises vaso-oclusivas podem ser resolvidas em domicílio, pela combinação de anti-inflamatórios e analgésicos opióides ou não opióides, com manutenção adequada da hidratação (STUART; NAGEL, 2004).

Alterações neurológicas podem surgir decorrentes de dores persistentes, que levam à maior sensibilidade dolorosa e sequelas psicossociais (BALLAS *et al.*, 2010).

Os leucócitos apresentam importante papel no desencadeamento e manutenção dos fenômenos vaso-oclusivos (CASTRO *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000).

A contagem basal de leucócitos elevada está associada com síndrome torácica aguda e infartos cerebrais silenciosos, com aumento da mortalidade; se encontram ativados na circulação, expressando proteínas na sua superfície, que aumentam a sua adesividade às paredes celulares e do endotélio. Os monócitos, que expressam as integrinas VL4, também encontradas nas hemácias falcizadas, se agrupam formando pontes de fibronectina. O enredamento das células falciformes pelos leucócitos aderentes contribui para a obstrução do vaso (CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). Leucometrias elevadas estão relacionadas com mau prognóstico, quando presentes já na infância (FRENETTE, ATWH, 2007).

### **2.3.1.2 Crises Dolorosas**

A dor é característica da doença falciforme, iniciando-se precocemente na infância e perdurando por toda a vida (BALLAS *et al.*, 2010), e foi definida pelo *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) como dores nas pernas, braços, costas, abdome, tórax e/ou crânio, com duração mínima de 2 horas, necessitando de cuidados médicos atribuídos à DF (MILLER *et al.*, 2000; INATI *et al.*, 2003). Também referem-se a episódios de dor óssea suficiente para interferir na função diária e necessitar de analgesia por narcótico (STUART; NAGEL, 2004).

Os episódios de dor aguda são o maior evento clínico das DF e são preditores de gravidade clínica e de morte precoce nos adultos sugerindo que o estresse oxidativo, provocado pela lesão induzida pela reperfusão e a inflamação, acelera a disfunção e a falência dos órgãos. Geralmente são precedidos por infecção, variações extremas na temperatura ambiente, desidratação e estresse físico ou emocional. Porém, em muitas situações não é possível identificar o antecedente desencadeante da crise (STEINBERG; HEBBEL, 1983).



O aumento da dor está associado ao aumento do hematócrito e a baixos níveis de HbF. Em geral, os pacientes SS apresentam crises vaso-oclusivas mais frequentes, mas alguns pacientes com doença SC ou com interação S-talassemia  $\beta^+$  podem desenvolver mais episódios de dor do que aqueles com genótipo mais grave, SS ou S-talassemia  $\beta^0$  o que sugere que fatores genéticos epistáticos influenciam na gravidade clínica (STUART; NAGEL, 2004).

A síndrome mão-pé caracterizada por inchaço doloroso das mãos ou dos pés ou em combinação é provocada pela dactilite e ocorre em crianças abaixo dos 3 anos de idade (MILLER *et al.*, 2000; INATI *et al.*, 2003; STUART; NAGEL, 2004; NDUGWA *et al.*, 2012).

### **2.3.1.3 Síndrome Torácica Aguda (STA)**

O CSSCD definiu a STA como a presença de infiltrados pulmonares recentes vistos ao raio X, associada a doença aguda do trato respiratório com possíveis combinações com febre, hipóxia ou dor torácica, sinais e sintomas de doença respiratória (INATI *et al.*, 2003; QUINN *et al.*, 2007).

É a segunda causa mais comum das internações hospitalares entre os pacientes com DF, sendo frequente a necessidade de internação em unidades de terapia intensiva. Assemelha-se clínica e radiologicamente à pneumonia bacteriana, porém na maioria dos casos a cultura não apresenta crescimento microbiano. Como em outras síndromes, a STA apresenta múltiplas etiologias, sendo mais branda quando desencadeada por pneumonia e mais grave quando desencadeada por embolia gordurosa. Está associada a alta morbimortalidade, aguda ou tardia (GLADWIN, VICHINSKY, 2008). Sua maior incidência está na faixa etária de 2 a 4 anos, declinando com a idade, porém continua frequente no adulto (BALLAS *et al.*, 2010). Nos pacientes adultos com AF a STA ocorre de 24 a 72 hs após o início de dores intensas nos braços, pernas ou tórax. Está associada com inflamação sistêmica, febre e leucocitose. Gladwin e Vichinsky, 2008, observaram que apesar de a hemoglobina mais elevada em pacientes sem crise de dor ser fator de risco para a STA, em pacientes hospitalizados, com crises por vaso-oclusão, a queda brusca nos níveis de Hb em média de 0,78g/dL em relação aos níveis basais, com aumento nos marcadores de hemólise, foram indicativos de STA eminente.

As plaquetas também diminuíram para valores iguais ou inferiores a  $200.000/\text{mm}^3$ , sendo fator de risco independente para manifestações graves da síndrome, associado a complicações neurológicas e necessidade de ventilação mecânica. No estudo, a ventilação mecânica foi necessária para 13% dos pacientes e 3% evoluíram para óbito. Esse procedimento diminuiu a taxa de mortalidade de 30% para 19%. A média de internação foi de 10,5 dias enquanto que, nos casos não graves, foi de 3 a 4 dias (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

#### **2.3.1.4 Sequestro Esplênico**

Na anemia falciforme, o sequestro esplênico agudo tem sido a causa mais frequente de morbidade e mortalidade, nos primeiros 5 anos de vida (MILLER *et al.*, 2000; BALLAS *et al.*, 2010), podendo ocorrer precocemente na 8.<sup>a</sup> semana de vida; porém na S-talassemia  $\beta$  e na doença SC, o primeiro evento pode ocorrer mais tardiamente ou mesmo na vida adulta (BALLAS *et al.*, 2010).

O diagnóstico de sequestro esplênico se baseia na queda da concentração de hemoglobina em pelo menos 2 g/dL dos níveis basais, aumento repentino do baço e evidência de represamento de hemácias dentro dele, atividade da medula, representada pela reticulocitose podendo ocorrer também o choque hipovolêmico. Estes sinais e sintomas também auxiliam na diferenciação da anemia por sequestro esplênico daquela dos episódios de aplasia de medula (TOPLEY *et al.*, 1981; MILLER *et al.*, 2000; INATI *et al.*, 2003; NDUGWA *et al.*, 2012). O aumento do baço geralmente é de pelo menos 2 cm (MILLER *et al.*, 2000; INATI *et al.*, 2003), ou  $\geq$  a 3cm abaixo da borda costal (NDUGWA *et al.*, 2012). A contagem de reticulócitos apresenta aumento de 25% em relação aos níveis basais e pode ocorrer trombocitopenia ( $< 150.000/\mu\text{L}$ ) (BALLAS *et al.*, 2010).

O sequestro esplênico é mais comum no segundo semestre de vida, mas com ocorrência também após os 2 anos de idade (TOPLEY *et al.*, 1981).

Em estudo prospectivo de coorte de 216 crianças SS, acompanhadas desde o nascimento até os 5 anos de idade na Jamaica, verificou-se que os sintomas geralmente são inespecíficos incluindo febre, tosse, diarreia e vômitos, palidez, sonolência, anorexia e dor óssea. Os casos fatais ocorreram em idade mediana de 17 meses (com variação de 8 a 54 meses). O sequestro esplênico pode variar desde sintomas sem gravidade até os casos fatais, onde não há tempo para chegar ao hospital para tratamento.

A gravidade clínica está relacionada à rapidez de instalação e o tratamento imediato inclui a correção da hipovolemia com transfusão de hemácias, com atenção especial à estabilização hemodinâmica. Devido à alta taxa de recorrência do sequestro esplênico (em torno de 50%), o acompanhamento é fundamental. As mães e os cuidadores devem ser orientados sobre a palpação do baço, bem como reconhecer os sintomas iniciais do episódio para a pronta intervenção. Às crianças com idade acima de 2 anos recomenda-se a esplenectomia logo após o primeiro episódio (STUART, NAGEL, 2004).

### **2.3.1.5 Acidente Vascular Cerebral (AVC)**

O CSSCD definiu o AVC como síndrome neurológica aguda, devida à vaso-oclusão vascular ou hemorrágica, na qual os sinais e sintomas neurológicos permanecem por mais de 24 horas (MILLER *et al.*, 2000; INATI *et al.*, 2003). Em geral, o déficit neurológico é permanente manifestando-se como hemiplegia, diferentemente da isquemia transitória que mostra déficit neurológico semelhante, porém retornando à normalidade dentro de 24 horas (NDUGWA *et al.*, 2012).

O hematócrito, a contagem de leucócitos e a presença da talassemia  $\alpha$  são alguns dos preditores da probabilidade da ocorrência do AVC, porém o melhor preditor é a estimativa da velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais (STEINBERG, 2005).

Como ferramenta de triagem, a ultrassonografia transcraniana pelo *doppler* possibilita a identificação de crianças SS com risco aumentado de AVC: são as que apresentam velocidades de fluxo sanguíneo nas porções mediana, cerebral ou distal da artéria carótida de  $\geq 200$  cm/s (BALLAS *et al.*, 2010).

Para estas, estão indicadas transfusões de troca, pela qual se removem hemácias falcizadas e se infundem hemácias HbS negativas, leucodepletadas e compatibilizadas para os principais antígenos dos sistemas Rh e Kell, para minimizar as reações transfusionais e aloimunizações.

A diminuição dos níveis de hemácias falcizadas para 50%, previne a recorrência do AVC (STUART, NAGEL, 2004).

### **2.3.2 Outras Manifestações Clínicas (Hipertensão Pulmonar, Úlceras de Perna, Priapismo)**

Além das manifestações descritas, são citadas outras apresentações, menos frequentes na criança. Entre elas, a hipertensão pulmonar que é um distúrbio caracterizado por elevações da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar, indicativa de mau prognóstico (MACHADO, 2007).

As úlceras de perna, definidas como úlceras ativas, que ocorrem pelo menos duas vezes em um período de 6 meses (NDUGWA *et al.*, 2012). As úlceras crônicas são comuns em adultos e normalmente ocorrem acima dos maléolos medial ou lateral e refletem a vascularização precária da pele nesta região, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (WEATHERALL *et al.*, 2001).

O priapismo, que se caracteriza por ereção dolorosa e constante nos meninos e nos adultos, que pode ocorrer por liberação excessiva de neurotransmissores contráteis, obstrução na drenagem das veias, mau funcionamento do mecanismo de relaxamento do pênis ou do músculo liso intracavernoso, não relacionada com a atividade sexual. O priapismo pode ser classificado em isquêmico (baixo fluxo) e não isquêmico (alto fluxo).

O isquêmico é mais comum e está associado com redução do retorno venoso, hipóxia, acidose, estase e isquemia tissular. Geralmente são episódios noturnos, com aumento na intensidade de dor em pouco tempo. Ambos os tipos podem levar à impotência (STUART; NAGEL 2004; NDUGWA *et al.*, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde, em seu Manual "Condutas básicas para tratamento, 2013" recomenda exercícios leves, como caminhada e ciclismo, no início da crise, além de banhos mornos, hidratação abundante e analgesia, como tratamento.

Não havendo melhora, indica-se exossanguineotransfusão parcial ou transfusão simples de concentrado de hemácias. Entretanto, podem ser necessárias medidas anestésico-cirúrgicas, como a punção dos corpos cavernosos, esvaziamento cirúrgico entre outros. São procedimentos de risco que podem levar a deformações do órgão genital e impotências definitivas.

## 2.4 CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME

Segundo o CSSCD, do ponto de vista clínico, quatro eventos adversos podem ser utilizados para medir a gravidade da DF: morte sabidamente causada pela DF; AVC, crises de dor intensas e STA (INATI, *et al.* 2003). Em um estudo americano de coorte, 392 crianças com DF (380 SS e 12 S $\beta^0$ ) foram acompanhadas por um período de 10 anos, sendo a média da idade de início do estudo de  $3,0 \pm 1,5$  meses até a idade de  $10,0 \pm 4,8$  anos. Os eventos adversos que categorizaram a gravidade clínica foram: morte relacionada à doença falciforme; AVC, uma média de pelo menos 2 eventos dolorosos/ano no período do estudo, com pelo menos 2 eventos/ano por 3 anos consecutivos, referidos como dores frequentes; pelo menos um episódio de STA/ano no período do estudo com pelo menos um episódio de STA/ano por 3 anos consecutivos, referidos como STA recorrentes (MILLER *et al.*, 2000).

Pela classificação do CSSCD, o quadro clínico pode ser definido como benigno se nenhum dos quatro eventos acima mencionados ocorrerem; moderado, se somente um deles estiver presente e grave, na ocorrência de pelo menos dois eventos (INATI *et al.*, 2003). Complementando esta classificação, a gravidade clínica pode ainda ser precoce ou tardia. O prognóstico precoce foi definido por internamentos nos primeiros 3 anos de vida por eventos de dor, além das dactilites e da STA. O prognóstico tardio, engloba os eventos que ocorrem após os 3 anos de idade, a saber: o primeiro AVC, os internamentos por eventos de dor, a STA e morte.

A probabilidade de experimentar um destes resultados adversos até os 10 anos de idade pode ser previsível por um modelo multivariável que inclui os seguintes fatores prognósticos: dactilite, complicação dolorosa resultante de vaso-oclusão (MILLER *et al.*, 2000), no primeiro ano de vida (dactilite precoce), leucocitose na ausência de infecção e níveis de hemoglobina menores do que 7g/dL, ambos já no segundo ano de vida (QUINN *et al.*, 2008).

As crises de dor por vaso-oclusão contribuem para o atendimento como emergências e hospitalizações, no subconjunto de pacientes com DF (ELLISON; BAUCHNER, 2007).

## 2.5 SÍNDROME DA PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA HbF FALCIFORME (HbS/PHHF) E A HbF COMO MODULADORA GENÉTICA NA DOENÇA FALCIFORME

A alteração hemoglobínica conhecida como Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) caracteriza-se pela falha no *switch* ou mudança da síntese de HbF para a HbA, que deve iniciar antes do nascimento; resulta em concentrações aumentadas de HbF, em torno de 20 a 35 vezes, na fase adulta, com ausência de manifestações clínicas significativas (OGEDEGBE, 2007).

A PHHF pode ocorrer nos casos de talassemia, duplicações do gene da globina  $\gamma$  ou rearranjos dentro do grupamento dos genes da globina  $\beta$  (AKINSHEYE *et al.*; 2011). No indivíduo normal, a produção da HbF continua na vida adulta, restringindo-se a 0,1 a 7,0% do total das hemácias, como células fetais (CF). A PHHF pode ser dividida em dois grupos: a heterocelular e a pancelular. Na forma heterocelular ou não deletional a HbF está presente em um pequeno subconjunto de hemácias ao passo que na PHHF pancelular, onde ocorrem deleções nos genes da  $\delta$  e globina  $\beta$ , a HbF está presente em todas as hemácias (OGEDEGBE, 2007).

A HbF auxilia na modulação da gravidade da DF de duas maneiras. Primeiramente, não participa no processo de polimerização que ocorre entre as moléculas de deoxi-HbS, pois a cadeia  $\gamma$  não tem a valina na posição 6 para interagir hidrofobicamente com as moléculas de HbS. Além disso, as altas concentrações de HbF dentro das células diminuem a concentração de HbS, diminuindo a concentração de deoxi-HbS, sua polimerização e a falcização intravascular (MURRAY; SERGEANT; SERGEANT, 1988; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007).

A heterogeneidade na concentração de HbF entre os pacientes talassêmicos e aqueles com DF, apresenta importante papel fisiopatológico: nos dois casos há relação direta entre concentrações de HbF e melhora no quadro clínico. Por isso, é importante determinar ou diferenciar a base genética do controle da expressão da HbF (LABIE *et al.*, 1985b).

As concentrações elevadas de HbF são influenciadas pela idade, pelo gênero, pela presença da talassemia  $\alpha$ , por um locus ligado a X e haplótipos da HbS podendo causar dificuldades no diagnóstico laboratorial (MARCUS *et al.*, 1997).

O Quadro 1 apresenta resultados de dois estudos comparativos entre as DF e a PHHF, realizados por Murray *et al.* (1988) e Marcus *et al.* (1997).

No estudo de Murray *et al.* (1988), os pacientes SS com níveis elevados de HbF apresentavam concentrações de hemoglobina total mais altas e contagens de reticulócitos mais baixas do que a média neste grupo de pacientes.

Naquele estudo, dois pacientes que apresentavam contagem de reticulócitos elevada, apresentavam evidência de hiperesplenismo que é reconhecida como uma das complicações dos altos níveis de HbF na anemia falciforme.

Para diferenciar estes dois grupos (HbS/PHHF e SS+HbF elevada) foi considerada a contagem de hemácias (> na HbS/PHHF), Hb (> na HbS/PHHF), a contagem de reticulócitos (< na HbS/PHHF), e a concentração de bilirrubina total (> na HbS/PHHF).

Entretanto, os parâmetros acima, nos pacientes SS, podem se sobrepor aos índices observados nos pacientes HbS/PHHF, por isso nem sempre é possível diferenciar-se as duas doenças por estes dados laboratoriais. Wainscoat *et al.* (1985), estudando 2000 pacientes SS encontraram apenas um caso de sobreposição. A análise conjunta da concentração de HbF e contagem de hemácias, permite a diferenciação na maioria dos casos (MURRAY *et al.*, 1988).

	SS		S <sup>+</sup> talassemia $\beta^0$		HbS/PHHF	
	Murray, Serjeant e Serjeant (1988)	Marcus <i>et al.</i> (1997)	Murray, Serjeant e Serjeant (1988)	Marcus <i>et al.</i> (1997)	Murray, Serjeant e Serjeant (1988)	Marcus <i>et al.</i> (1997)
Número de pacientes	10	130	4	7	13	8
HbA2 (%) Média $\pm$ DP	2,02 $\pm$ 0,16	Não analisado	3,68 $\pm$ 0,46	Não analisado	2,0 $\pm$ 0,21	Não analisado
Idade (anos) Média (amplitude de variação)	9 (6-33)	8,7 $\pm$ 4,8	12 (9-18)	6,6 $\pm$ 3,6	10(6-60)	10,1 $\pm$ 7,8
HbF(%) Média $\pm$ DP (amplitude de variação)	21,6 $\pm$ 2,0	10,4 $\pm$ 6,3 (1,5-28,9)	24,2 $\pm$ 2,7	15,4 $\pm$ 10,3 (3,4-28,0)	29,2 $\pm$ 3,2	31,7 $\pm$ 3,0 (26,8-37,4)
Hb (g/dL) Média $\pm$ DP	10,2 $\pm$ 1,5	8,0 $\pm$ 1,0	10,9 $\pm$ 0,9	8,4 $\pm$ 1,7	13,4 $\pm$ 1,4	12,8 $\pm$ 1,4
VCM (fL) Média $\pm$ DP	89,2 $\pm$ 5,6	85,0 $\pm$ 8	75,0 $\pm$ 5,6	69,0 $\pm$ 4,0	78,4 $\pm$ 8,0	78,0 $\pm$ 9,0
HCM (pg) Média $\pm$ DP	30,3 $\pm$ 2,0	29,3 $\pm$ 3,2	24,2 $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 1,9	26,1 $\pm$ 2,7	26,8 $\pm$ 2,6
CHCM (g/dL) Média $\pm$ DP	34,7 $\pm$ 1,5	34,0 $\pm$ 1,2	33,5 $\pm$ 1,0	32,7 $\pm$ 1,2	34,4 $\pm$ 1,2	34,7 $\pm$ 1,1
Reticulócitos (%) *log <sub>10</sub> (retics+1)=log calculado	*8,31 $\pm$ 7,3	14,3 $\pm$ 6,4	*4,57 $\pm$ 3,6	7,0 $\pm$ 2,6	*2,95 $\pm$ 1,9	1,8 $\pm$ 0,4

QUADRO 1 - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS DOENÇAS FALCIFORMES SS, S-TALASSEMIA  $\beta^0$  E HbS/PHHF

FONTE: A autora

NOTA:DP: desvio-padrão; HbF: hemoglobina fetal; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.



## 2.6 HIDROXIURÉIA: A INIBIÇÃO QUÍMICA DO PROCESSO DE POLIMERIZAÇÃO DA HbS

A hidroxiuréia (HU) foi sintetizada, pela primeira vez, na Alemanha, por Dressler e Stein, em 1869. Em 1967, este medicamento foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de doenças neoplásicas e posteriormente para o tratamento de pacientes com leucemia mielóide crônica, psoríase e policitemia vera. A HU aumenta tanto a porcentagem de hemácias que expressam a HbF em proporção detectável também conhecidas por células fetais (CF) quanto a de HbF (MARCUS *et al.*, 1997). Com o uso da HU pode haver um incremento de até 11% de HbF (CHARACHE *et al.*, 1992). Para um paciente que inicia com valores de 2% de HbF, o aumento para 13% aumentaria a porcentagem de CF de aproximadamente 20% até 70% (MARCUS *et al.*, 1997).

O mecanismo de ação provável decorre do fato de que a citotoxicidade da HU provoca a regeneração eritróide. Na metabolização da HU há um aumento do NO, que por processo bioquímico aumenta a expressão do gene da globina  $\gamma$ , intensificando-se a produção da HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e o paciente apresenta melhora nos sintomas da DF (STEINBERG, 2005). Como efeito secundário, diminui a contagem de neutrófilos, que se aderem à fibronectina, a liberação de reticulócitos da medula óssea e os níveis de VCAM-1 solúveis (BUNN, 1997; DE FRANCESCHINI; CORROCHER, 2004).

No Brasil, a partir de 1998, a HU passou a fazer parte do arsenal terapêutico para pacientes com DF, tornando-se o primeiro medicamento que comprovadamente previne complicações clínicas, melhora a qualidade de vida e aumenta a sobrevida de pacientes com DF (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

Em 2005, a HU ainda era considerada a única substância específica para o tratamento das complicações da AF, sendo usada em muitos países (STEINBERG, 2005).

## 2.7 HAPLÓTIPOS DA HbS

### 2.7.1 Características Geográficas e Moleculares dos Haplótipos da HbS

A variabilidade nas características clínicas e hematológicas entre os diferentes pacientes com anemia falciforme (CAMERON *et al.*, 1983), pode estar parcialmente associada aos haplótipos (PAGNIER *et al.*, 1984). Os numerosos sítios polimórficos ao longo de um complexo gênico e as diferentes combinações desses sítios, no mesmo cromossomo, definem o haplótipo (NAOUM; NAOUM, 2004). São as coleções de variáveis ou genes (*SNPS*) em dois ou mais loci, que são herdados de cada um dos pais em conjunto, como um bloco, pois estão intimamente ligados (FARAH, 2007; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007). O haplótipo pode ser definido como uma associação não randômica de sítios independentes ao redor do complexo gênico da globina  $\beta$  (LU; STEINBERG, 1996). Pode ser usado como um marcador genético herdado dos ancestrais e é ferramenta eficiente para demonstrar os antecedentes moleculares de alelos da globina  $\beta$  normal ou variante (BOEHM *et al.*, 1985). Especificamente na anemia falciforme, apontam para a heterogeneidade dos sintomas nos pacientes (STEINBERG *et al.*, 1998).

Cada haplótipo está associado a variações polimórficas no *cluster* ou grupamento dos genes da HBB, distintos dos sítios identificados por enzimas de restrição, que atuam como marcadores para um dado haplótipo (LU; STEINBERG, 1996, DAAR *et al.*, 2000).

Com a técnica da análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), os pesquisadores encontraram haplótipos distintos dentro e ao redor das dezenas de kilobases que compõem o *cluster* do gene da globina  $\beta$ . Em 1984, Pagnier *et al.* mostraram que, em quatro populações africanas com significativa frequência de traço falciforme, três haplótipos estavam presentes nos pacientes com anemia falciforme que tinham quase na sua totalidade, a mesma origem geográfica. Pacientes dos países Benin e Argélia eram homozigotos para o tipo BENIN (BEN) enquanto que mais de 80% dos pacientes da República Central Africana e do Senegal eram homozigotos para haplótipos do tipo CAR (República Central Africana) e SENEGAL (SEN) respectivamente.

O estudo de Pagnier *et al.* (1984) sugere que o gene da HbS teve três origens independentes e sofreu seleção geográfica e de reprodução em populações isoladas. Além disso, os estudos de Lapoumèroulie *et al.*, em 1992, identificaram outro haplótipo diferente dos três acima, nomeado como haplótipo CAMARÕES (CAM), em pacientes falciformes do grupo étnico Eton, na região leste de Camarões mostrando que a HbS pode ter tido quatro origens independentes (GABRIEL; PRZYBYLSKI, 2010).

O quinto haplótipo, ÁRABE-INDIANO ou ASIÁTICO, é encontrado na parte leste da Arábia Saudita e no centro da Índia (RAHIMI *et al.*, 2003; EL-HAZMI; AL-HAZMI; WARSY, 2011).

Até o ano de 2015, a mutação  $\beta^S$  do locus da globina  $\beta$  está associada com cinco haplótipos "clássicos" que, por sua vez, estão relacionados com as diferentes regiões geográficas na África Sub-Saariana, Arábia e Índia, tendo sido nomeados de acordo com a sua provável origem geográfica - BEN, CAR (África Central), CAM, SEN e ÁRABE-INDIANO (Figura 6). Em geral, dentro do grupo étnico onde o alelo  $\beta^S$  tem alta frequência, existe a predominância de um haplótipo em particular (HANCHARD *et al.*, 2007; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRISTAKI, 2007).

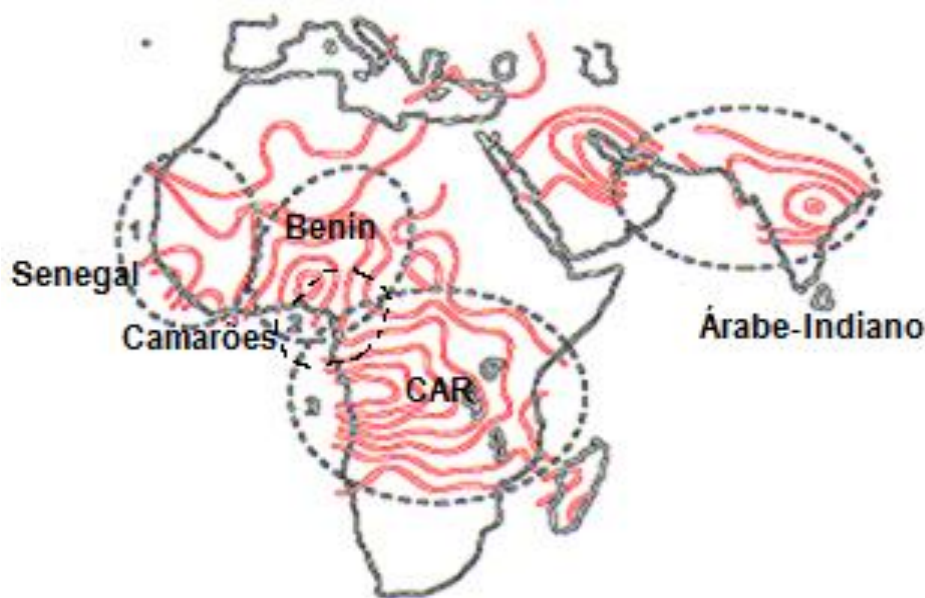


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA  $\beta^S$  NA ÁFRICA

Adaptado de: <http://www.hemoglobinopatias.com.br/d-falciforme/genebs.htm>.

Acesso em 03.10.2015

No contexto laboratorial, estes haplótipos foram geneticamente identificados e definidos pela presença ou ausência de um ou mais dos cinco sítios de restrição em direção a 5' do gene da globina  $\beta$  e a três ou quatro sítios no fragmento de 5' ou de 3' para o 5' (LIVINGSTONE, 1989). Foram identificados por enzimas de restrição (RFLP), na região que compreende do gene  $\epsilon$  ao gene da globina  $\beta$  (LIU *et al.*, 2009), e se caracterizam por forte desequilíbrio de ligação através do *hot-spot* de recombinação que são os locais onde as mutações ocorrem com mais frequência, exatamente em 5' do gene da globina  $\beta$  (HANCHARD *et al.*, 2007). O desequilíbrio de ligação ocorre em combinações específicas de alelos em fase de acoplamento em dois ou mais loci, ligados com maior frequência do que se poderia esperar pelo acaso (THOMPSON; THOMPSON, 2002).

A técnica de RFLP é utilizada para a determinação de haplótipos presentes no trecho de 63 kb do DNA subdivididos em 34 kb a 5', 19 kb a 3' e 9 kb no domínio central. Na região de 5' a 3' os sítios de restrição possuem associação não randômica, enquanto que na região central a associação, tanto com o domínio 5' como com 3', é randômica (STEINBERG *et al.*, 1998).

### 2.7.2 Identificação Molecular e Características Clínico-Laboratoriais dos Haplótipos da HbS

A identificação dos haplótipos da HbS pode ser realizada pela atividade de enzimas de restrição sobre regiões especificadas no grupamento do gene da globina  $\beta$  (Figura 7).

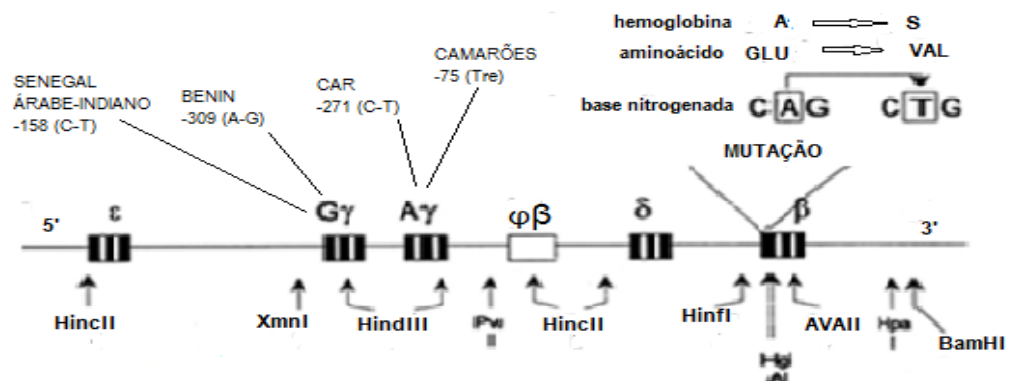


FIGURA 7 - GRUPAMENTO DO GENE DA GLOBINA  $\beta$ , POLIMORFISMOS, HAPLOTIPOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

FONTE: adaptado de Naoum (2000)

Os haplótipos da globina  $\beta^S$  podem ser definidos pelo Quadro 2, adaptado de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989), Lapoum  roulie *et al.* (1992) e Joly *et al.* (2011).

Haplótipos	ENZIMAS DE RESTRI��O								
	$\epsilon$ Hinc II	5' $\gamma^G$ Xmn I	$\gamma^G$ Hind III	$\gamma^A$ Hind III	$\phi\beta$ Hinc II	3' $\phi\beta$ Hinc II	5' $\beta$ Hinf I	$\beta$ Ava II	3' $\beta$ BamHI
CAR - BANTU	-	-	+	-	-	-	-	+	+
BENIN	-	-	-	-	-	+	-	+	+
SENEGAL	-	+	+	-	+	+	+	+	+
ARABE-INDIANO	+	+	+	-	+	+	-	+	-
CAMARQUES	-	-	+	+	-	+	+	+	-

QUADRO 2 -DEFINI  O DOS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA  $\beta^S$ , SEGUNDO RECONHECIMENTO PELAS ENZIMAS DE RESTRI  O.

FONTE: Adaptado de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989), Lapoum  roulie *et al.* (1992) e Joly *et al.* (2011)

### 2.7.2.1 Haplótipos CAR (Bantu) e BENIN

O haplótipo CAR também denominado BANTU, predomina no grupo étnico africano banto. Foi primeiramente descrito na República Central da África, citado por Pagnier, 1984 (LIVINGSTONE, 1989), sendo as iniciais da região geográfica o termo mais utilizado. Caracteriza-se pela troca de "C" por "T" na posi  o -271 5' para o gene  $\gamma^A$ . O paciente com haplótipo CAR possui relativamente maior concentra  o de HbF (média 10,4%) em rela  o ao haplótipo BEN e baixa porcentagem de células irreversivelmente falcizadas (ISC), assim como no haplótipo SEN. Estes, por sua vez, possuem baixa porcentagem de  $\gamma^G$  (média de 40%) assim como os pacientes com o haplótipo BEN. Pacientes com o haplótipo CAR podem ser subdivididos em 2 grupos: um com porcentagem de  $\gamma^G < 38\%$  e baixos níveis de HbF (média 6,3%) e outro com porcentagem de  $\gamma^G > 38\%$  e níveis mais altos de HbF (média de 12,5%) (MONTH *et al.*, 1990).

O haplótipo BENIN predomina na região da África com o mesmo nome. Também está presente em muitas popula  es mediterrâneas, no leste e oeste da   rabia Saudita (LIVINGSTONE, 1989).    muito frequente (em torno de 92%) no grupo   tnico Yoruba na Nigéria. Fora da África, predomina na Jamaica (em torno de 71%) (HANCHARD *et al.*, 2007). Caracteriza-se por pela troca de "A" por "G" na posi  o -309, 5' para o gene  $\gamma^G$  (MONTH *et al.*; 1990).

### 2.7.2.2 Haplótipo SENEGAL (SEN)

O haplótipo SEN assim como o ÁRABE-INDIANO, está ligado ao polimorfismo C→T na posição -158 na região 5'  $\gamma^G$  (MONTH *et al.*, 1990; BHAGAT; PATRA; THAKUR, 2013), com aumento no número de cadeias  $\gamma'$  e consequente aumento de HbF (BHAGAT, 2013). A média da HbF é em torno de 12,1% (PAGNIER *et al.*, 1984; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI; 2007) e baixa percentagem de células irreversivelmente falcizadas (ISC). Nestes pacientes, a HbF tem alta percentagem de cadeia  $\gamma^G$  (média de 69,7%), que normalmente é encontrada em crianças (70%  $\gamma^G$  /30%  $\gamma^A$ ) contrário aos 40% de  $\gamma^G$  encontrados após os primeiros anos de vida (MONTH *et al.*, 1990).

Os sintomas clínicos e a significância genética das altas concentrações de HbF nos pacientes senegaleses com doença SS são de difícil interpretação devido ao pequeno número de pacientes e os poucos dados reportados. Os altos níveis de HbF parecem estar restritos apenas aos pacientes homozigotos para este haplótipo (PAGNIER *et al.*, 1984; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI; 2007).

Por outro lado, dentre os haplótipos africanos em homozigose, é o que apresenta concentrações mais elevadas de HbF, o que sugere que esteja associado com quadro clínico benigno, particularmente em relação ao grau de hemólise (NAGEL *et al.*, 1991, RAHIMI *et al.*, 2003).

Os exames laboratoriais de pacientes americanos descendentes de africanos que portavam pelo menos um haplótipo SEN apresentavam níveis de Hb significativamente mais alta, contagem de reticulócitos diminuída, níveis de bilirrubina e LDH baixos. Quando se analisa a hemoglobina, concentração de  $\gamma^G$ , HbF e porcentagem de células densas, este haplótipo se diferencia dos demais, sugerindo que pacientes com este grupamento apresentam anemia mais branda do que as combinações entre BEN, CAR e atípico (NAGEL *et al.*, 1991).

Oner *et al.* (1992) constataram que em alguns cromossomos com mutação da talassemia  $\beta$ , o comportamento das enzimas de restrição podem ser similares aos encontrados para o haplótipo SEN.

Em estudo multicêntrico, os haplótipos da HbS foram identificados em 709 pacientes SS, 30 pacientes SC, 91 pacientes S-talassemia  $\beta$  e 322 heterozigotos AS de diferentes países. Observaram que em 32 cromossomos com a mutação da talassemia  $\beta$ , em 3 cromossomos o haplótipo que denominaram de "A", era similar ao haplótipo SEN. Cinco cromossomos com o haplótipo que denominaram "B" eram similares ao haplótipo BEN e possuíam a mutação -657 G→T ( $\gamma^A$ ), mas somente um cromossomo tinha a mutação C→G em -369 ( $\gamma^G$ ) e um cromossomo com haplótipo "atípico" possuía polimorfismo semelhante ao haplótipo CAR. Neste estudo, os pacientes SS com o haplótipo CAR/CAR apresentaram maior gravidade clínica, seguidos pelos pacientes com o genótipo BEN/BEN. Os pacientes com o genótipo ÁRABE-INDIANO em homozigose mostraram anemia leve a moderada com média de hemoglobina de 10,0 g/dL. Houve variação da HbF mas na média esteve abaixo de 10,0 nos pacientes homozigotos para CAR, BEN e CAM. Valores mais elevados de HbF e de  $\gamma^G$  foram observados nos pacientes SS com os genótipos homozigotos para SEN e ÁRABE-INDIANO (ONER *et al.*, 1992).

Para diferenciar o haplótipo ÁRABE-INDIANO do SEN, Oner *et al.* (1992), sugerem avaliar características étnico-raciais, mas é possível que o sítio polimórfico seja reconhecido pela enzima HinfI na região 5' $\beta$  no haplótipo SEN e não seja reconhecido no haplótipo ÁRABE-INDIANO. Pode-se também usar a enzima HincII na região  $\epsilon$ . Para o haplótipo ÁRABE-INDIANO há identificação do sítio de restrição pela enzima HincII e no haplótipo SEN, não há identificação. Com a enzima BamHI na região 3' $\beta$ , não há reconhecimento da região no haplótipo ÁRABE-INDIANO e reconhecimento no haplótipo SEN (ONER *et al.*, 1992).

### 2.7.2.3 Haplótipo CAMARÕES (CAM)

O haplótipo CAM, pouco frequente no Brasil, estava restrito na África, no grupo étnico Eton e foi primeiramente descrito por Lapoumeroulie (LAPOUMÉROULIE *et al.*, 1992), como uma nova mutação da célula falciforme na África. Apresenta diferença dos outros haplótipos, nas regiões 5' e 3' do gene da globina  $\beta$ , identificadas com o uso de enzimas de restrição (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CHRISTAKI, 2007). Na região 5', a maior diferença consiste na presença do sítio de restrição reconhecido pela enzima HindIII na IVS2 da cadeia  $\gamma^A$ . O sítio de restrição está associado à presença da treonina na posição 75 da cadeia  $\gamma^A$ .

Até o estudo de Lapoumeroulie *et al.*, 1992, este sítio de restrição não tinha sido encontrado nos principais cromossomos da  $\beta^S$ . A maior diferença, em relação aos outros haplótipos, reside na ausência do sítio de restrição BamHI na região 3'  $\beta$ , 8kb a montante de todos os outros genes  $\beta^S$  africanos.

Além do CAM, o único haplótipo do gene  $\beta^S$  que não contém este sítio de restrição, é o ÁRABE-INDIANO. A distribuição de HbF nos pacientes estudados com haplótipo CAM em homozigose, na África, variou de 1,7% a 18,9%, com quadro clínico grave, semelhante aos pacientes com o haplótipo BEN (LAPOUMÉROULIE *et al.*, 1992).

#### 2.7.2.4 Haplótipo ÁRABE-INDIANO ou ASIÁTICO

O haplótipo ÁRABE-INDIANO foi primeiramente descrito por Kulozik *et al.*, em 1987. Aqueles autores analisaram os sítios gênicos com as respectivas enzimas de restrição  $\epsilon$  (HincII); 5'  $\gamma$  (XmnI);  $\gamma^G$  (HindIII);  $\gamma^A$  (HindIII);  $\phi\beta$  (HincII); 3' $\phi\beta$  (HincII) e  $\beta$  (BamHI) que eram semelhantes ao achado de Antonarakis *et al.* (1984) (++++++) (ANTONARAKIS *et al.*, 1984). Como este haplótipo está ligado ao gene da globina  $\beta^S$  na Arábia Saudita e na Índia e não na África, foi designado como haplótipo ASIÁTICO. No estudo de Kuzolik *et al.* (1987), em 141 indivíduos AS, o perfil encontrado por Antonarakis *et al.* (1984) foi encontrado em homozigose em 7 dos indivíduos AS, sugerindo sobreposição do haplótipo ÁRABE-INDIANO com sítios da globina  $\beta$  normal; em 120 ocorreu em heterozigose e não foi encontrado em 14 indivíduos (KUZOLIK *et al.*, 1987). O haplótipo ÁRABE-INDIANO, assim como o SEN está associado com a mutação C→T na posição -158 da região 5' do gene  $\gamma^G$ , (LABIE *et al.*, 1985b), na região promotora (INATI *et al.*, 2003) e estão relacionados com curso benigno da DF atribuído à alta concentração de HbF (NAGEL *et al.*, 1985; DAAR *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*; 2012), em níveis próximos ou superiores a 20% (INATI *et al.*, 2003).

A média de porcentagem de HbF nos pacientes SS com os haplótipos acima citados, no Irã foi de 27,83%, que é mais elevada do que a encontrada na Arábia Saudita, de 13,34% e 16,4% na Índia. A alta concentração de HbF asiática está associada com a presença do sítio de restrição XmnI que mostra a sequência -157 a -166 do gene  $\gamma^G$  se a timina (T) estiver na posição -158 e é detectável pela digestão da enzima XmnI (RAHIMI *et al.*, 2003; LABIE *et al.*, 1985a), conforme foi descrito por Gilman e Huismann, em 1985.



Existem importantes implicações nos marcadores hematológicos como níveis elevados de hemoglobina e baixa contagem de reticulócitos, de células falcizadas, de irreversivelmente falcizadas e baixos níveis de bilirrubina, todos compatíveis com baixa intensidade de hemólise (MONTH *et al.*, 1990). O quadro clínico em geral é mais brando com poucos episódios de vaso-oclusão (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI; 2007).

#### **2.7.2.5 Haplótipo Atípico**

O haplótipo considerado “atípico” é aquele que não se enquadra em nenhum dos perfis descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2013) (Quadro 2). Na DF e na anemia falciforme, pode ser o resultado de recombinações entre os haplótipos mais frequentes e os haplótipos raramente associados com o gene da globina  $\beta$  (STEINBERG *et al.*, 1998).

A miscigenação com genes caucasóides produz a diversidade genética, observada na América do Norte, onde o haplótipo  $\beta^S$  atípico é mais frequente do que em qualquer lugar da África (STEINBERG *et al.*, 1998).

### **2.8 INTERAÇÃO S-TALASSEMIA $\beta$ E HAPLÓTIPOS DA TALASSEMIA $\beta$**

No Brasil, a talassemia  $\beta$ , que se caracteriza pela redução ou ausência da expressão do gene da globina  $\beta$ , dependendo da região geográfica, é um problema de saúde pública. A doença tem origem em regiões da Europa mediterrânea e da Ásia. Até 2009, mais de 200 mutações com os fenótipos talassêmicos  $\beta^0$  ou  $\beta^+$  foram reportadas, em diferentes partes do mundo (BAHADIR *et al.*, 2009).

A detecção do traço talassêmico ocorre primeiramente pelos exames hematológicos. Na talassemia  $\beta$  as hemácias são microcíticas e hipocrômicas (RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007).

Na co-herança da talassemia  $\beta$  com a HbS, a ausência de síntese de cadeias  $\beta$  ( $S\beta^0$ ) resulta em quadro clínico grave (quanto maior a proporção de HbS na hemácia, maior a chance de formação de tactóides) enquanto que a sua produção diminuída ( $S\beta^+$ ) em geral resulta em quadro clínico mais brando (SALEH-GOHARI; MOHAMMADI-ANAIE, 2012). Quando, no heterozigoto da HbS com a HbA a maior proporção é da HbS resultará nos genótipos S-talassemia  $\beta$  (Quadro 3). Por outro lado, quando a proporção de HbS está abaixo de 45% (e sempre abaixo de 50%) em relação à HbA e valores ainda menores na presença de talassemia alfa, resultará no heterozigoto sadio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

GENÓTIPO	INTERAÇÃO DE GENES	GRAVIDADE CLÍNICA	% DO TIPO DE Hb/TOTAL Hb			
			HbS	HbA	HbF	HbA2
HbS $\beta^0$	$\beta^S$ e tal $\beta^0$	grave	93,0	-	2,0	5,0
HbS $\beta^+$	$\beta^S$ e tal $\beta^+$ mutação talassêmica grave	moderada	85,0	6,0	5,0	4,0
HbS $\beta^+$	$\beta^S$ e tal $\beta^+$ mutação talassêmica branda	branda	70,0	23,0	3,0	4,0

QUADRO 3 - GENÓTIPOS E FENÓTIPOS DA S-TALASSEMIA  $\beta$

FONTE: Adaptado de Frenette e Atweh (2007)

O gel de eletroforese permite o diagnóstico definitivo na maioria das doenças falciformes, mas não em todos os genótipos. Na doença falciforme, a presença de Hb A em concentração menor do que a HbS é indicativa de doença S-talassemia  $\beta^+$ . Por outro lado, quando não se detecta a HbA na eletroforese, pode-se equivocadamente ter o diagnóstico de anemia falciforme, ao invés de S-talassemia  $\beta^0$ . A elevação da HbA<sub>2</sub> (FRENETTE; STWEH, 2007) (>3,5%) (MARCUS *et al.*, 1997; RAHIMI *et al.*, 2003) e um baixo VCM são sugestivos da interação S-talassemia  $\beta^0$  (FRENETTE; STWEH, 2007). Nestes casos, onde os testes hematológicos, bem como os estudos familiares não conseguem determinar o provável gene envolvido, faz-se necessário a realização da pesquisa molecular com análise de DNA (RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007).

As primeiras mutações talassêmicas  $\beta$  foram identificadas pela clonagem e sequenciamento do gene da globina  $\beta$ , isolados de pacientes com talassemia  $\beta$  maior (ORKIN; NATHAN, 2003). Como algumas mutações no gene da globina  $\beta$  são muito frequentes e para facilitar a procura pelas mutações talassêmicas  $\beta$ , foi introduzido o conceito de análise de haplótipos para o estudo da talassemia. Estes polimorfismos são de ocorrência naturais, geneticamente neutros, e podem ocorrer a cada 100 pb. Para definir nove haplótipos, (identificados pelos números romanos de I a IX), no grupamento da globina  $\beta$ , foram utilizadas sete enzimas de restrição na técnica RFLP, para a análise das mutações talassêmicas de 91 cromossomos de pacientes  $\beta$  talassêmicos de origem mediterrânea, que apresentavam os fenótipos  $\beta^0$  e  $\beta^+$  (ORKIN *et al.*, 1982; ORKIN, NATHAN, 2003; BAHADIR *et al.*, 2009). Assim como os haplótipos da globina  $\beta^S$ , as pesquisas demonstraram haver associação não randômica dos genes da mutação da talassemia  $\beta$  (BAHADIR *et al.*, 2009).

Lee *et al.* (2002), analisaram 7 sítios polimórficos de 9 cromossomos da globina  $\beta$ , de pacientes portadores de talassemia  $\beta$  e familiares, usando 4 enzimas de restrição, a saber: HincII 5'  $\epsilon$ , HindIII  $\gamma^G$ , e  $\gamma^A$ ; HincII 5'  $\phi\beta$  e 3'  $\phi\beta$ , Avall em  $\beta$ , e BamHI em 3'  $\beta$  (LEE *et al.*, 2002) e obtiveram os resultados frequentes na população coreana: - + - + + - +; + - - - - +; + - - - - +; + - - - - +; + - - - - +; - + + - + + - (LEE *et al.*, 2002) (Figura 8).

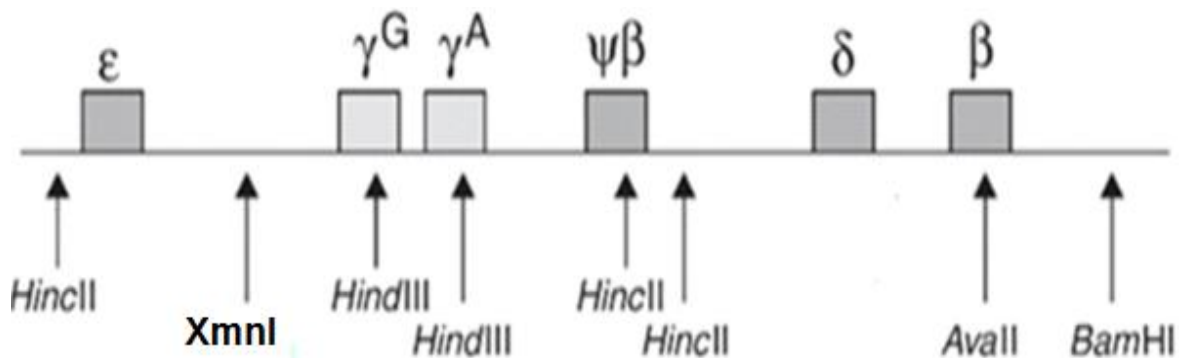


FIGURA 8 - GRUPAMENTO DO GENE DA GLOBINA  $\beta$  ANALISADO POR LEE *et al.*, 2002

FONTE : Adaptado de Torres, Okumura Bonini-Domingos (2015)

O Quadro 4 demonstra os haplótipos da talassemia  $\beta$ , obtidos pelas enzimas de restrição, citados por Orkin *et al.* (1982) e adaptado de Labie *et al.* (1985a).

HAPLÓTIPOS Talassemia $\beta$	SÍTIOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO							
	$\epsilon$ Hinc II	5' $\gamma^G$ XmnI <sup>(1)</sup>	$\gamma^G$ Hind III	$\gamma^A$ Hind III	$\phi\beta$ Hinc II	3' $\phi\beta$ Hinc II	$\beta$ Ava II	3' $\beta$ BamHI
I	+	-	-	-	-	-	+	+
II	-	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	+	-	+	+	+	-
IV	-	NT	+	-	+	+	-	+
V	+	-	-	-	-	-	+	-
VI	-	-	+	+	-	-	-	+
VII	+	NT	-	-	-	-	-	+
VIII	-	NT	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	+	-	+	+	+	+

QUADRO 4 - HAPLÓTIPOS DA TALASSEMIA  $\beta$

FONTE: Adaptado de Orkin *et al.* (1982), e (1) Labie *et al.* (1985a)

NOTA: NT: não testado.

Labie *et al.* (1985a) descrevem que os haplótipos talassêmicos  $\beta$ III e IX estão associados com significativo aumento de HbF, pelo aumento na expressão do gene  $\gamma^G$ , que é reconhecido pela enzima de restrição XmnI. Entretanto, as enzimas que reconhecem os polimorfismos no haplótipo III da talassemia  $\beta$  se sobrepõem sobre os mesmos sítios no haplótipo IX, diferenciando-se apenas em relação à enzima BamHI (IX+), que por sua vez atua de forma semelhante à restrição apresentada no haplótipo SEN da HbS (LABIE *et al.*, 1985a). Por isso, o conhecimento do fenótipo da doença auxilia na identificação dos haplótipos. O haplótipo III não tem níveis de HbF tão altos quanto o haplótipo IX, sugerindo que o controle de HbF e a expressão da globina  $\gamma^G$  podem não estar sob controle idêntico. O haplótipo I está associado com baixas concentrações de globina  $\gamma^G$ , níveis baixos de HbF e curso clínico mediano, incluindo diagnóstico precoce (LABIE *et al.*, 1985b).

Os haplótipos I e V da talassemia  $\beta$  estão associados com a baixa expressão da cadeia  $\gamma^G$  e clinicamente são classificados como anemia de Cooley.

O sítio XmnI está ausente no haplótipo II da talassemia  $\beta$ , apesar destes pacientes mostrarem alta expressão do gene  $\gamma^G$ .

Os haplótipos I, II e V não têm o sítio de restrição identificado por XmnI; enquanto que os haplótipos III e IX apresentam o sítio de restrição para esta enzima e acentuada expressão do gene  $\gamma^G$ . O tipo II quando em homozigose, também apresenta acentuada expressão do gene  $\gamma^G$  mesmo na ausência do sítio identificado por XmnI (LABIE *et al.*, 1985b).

As características clínicas da interação S-talassemia  $\beta$  são extremamente variáveis, desde o estado completamente assintomático a alterações graves semelhantes à anemia falciforme. Esta heterogeneidade pode ser devida à presença de diferentes alelos da talassemia  $\beta$ , ou a interações com fatores genéticos moduladores como a associação com a talassemia  $\alpha$  e/ou gene para a produção aumentada da HbF (polimorfismo XmnI). A heterozigose para este polimorfismo provavelmente influencia no fenótipo (PANDEY *et al.*, 2012).

Labie *et al.* (1985b) mostram evidências de que os níveis de HbF e a composição da globina  $\gamma^G$  estão associados para definir o haplótipo do grupamento da globina  $\beta$ , no cromossomo 11. Neste estudo, os haplótipos associados com o aumento da HbF e níveis elevados de  $\gamma^G$  eram os mesmos para a talassemia  $\beta$  e a anemia falciforme.

Nos pacientes com talassemia  $\beta$ , no oeste do Irã, avaliados por Pandey *et al.* (2012), a presença do sítio polimórfico XmnI em homozigose (+/+) mostrou que os níveis de HbF tendem a estar aumentados se comparados com a ausência do sítio (-/-), o mesmo ocorrendo nos pacientes com a interação S $\beta$ -talassemia (PANDEY *et al.*, 2012).

## 2.9 DOENÇA DA HbSC E HAPLÓTIPOS DA HbC

A hemoglobina C, outra variante da globina  $\beta$ , é encontrada em alta frequência no oeste africano e está associada a três haplótipos, classificados como I, II e III por Boehm *et al.*, 1985 (BOEHM *et al.*, 1985; LIVINGSTONE, 1989).

A hemoglobina C é o resultado da substituição do ácido glutâmico (que na anemia falciforme está substituído por uma valina no 6.º códon do gene HBB) por uma lisina ( $\beta 6$  [A3] Glu  $\rightarrow$  Lys) (BOEHM *et al.*, 1985; GHANSAH *et al.*, 2012).

A característica fisiopatológica da HbC é a capacidade de induzir à desidratação eritrocitária. Enquanto a desoxi-HbS polimeriza, a oxi-HbC mostra acentuada tendência para a cristalização intraeritrocitária, que junto com a desidratação celular induz a perda de  $K^+$  e água. Este mecanismo intensifica a tendência da porção "S" de se polimerizar. Portanto, a fração da HbC acentua as propriedades deletérias da HbS, com quadro clínico significativo, porém mais brando do que a anemia da HbS em homozigose (NAGEL, 2003). Assim, pacientes com hemoglobinopatia SC desenvolvem doença mais grave do que aqueles com hemoglobina C em homozigose, que é praticamente assintomática (BOEHM *et al.*, 1985).

Os cristais da HbC formam-se onde há baixas concentrações de HbF. Por isso, o uso da HU contribui para inibir a cristalização da HbC (NAGEL, 2003).

O curso clínico no paciente SC jovem é brando com raros casos descritos de septicemia ou AVC durante a primeira década de vida. A infância se desenvolve quase que dentro da normalidade. Tanto a disfunção esplênica quanto os eventos tromboembólicos, como a retinopatia e necrose das papilas renais com dificuldade na concentração renal, começam a ocorrer no final da adolescência (POWARS *et al.*, 2002).

Episódios de vaso-oclusão não são característicos da HbC pois os cristais de oxi-HbC se dissolvem quando a  $pO_2$  é baixa (NAGEL, 2003). Os haplótipos do gene da globina  $\beta^C$  em combinação com o haplótipo BEN em geral, apresentam baixas concentrações de HbF (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003).

Em nível molecular, as enzimas de restrição mostram os sítios polimórficos dos haplótipos da HbC que são as variantes moleculares na globina  $\beta^C$ , fornecendo informações para inferir a origem desta globina (BOEHM *et al.*, 1985).

Boehm *et al.* (1985) utilizaram as enzimas de restrição HindIII para  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$ , HincII para o sítio 3', HinfI para 5' $\beta$ , Avall para o sítio  $\beta$  e HpaI e BamHI para o sítio 3' $\beta$ , obtendo o perfil do Quadro 5.

HAPLÓTIPOS	SÍTIOS E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO							
	$\gamma^G$ Hind III	$\gamma^A$ Hind III	$\phi\beta$ Hinc II	3' $\phi\beta$ HincII	5' $\beta$ Hinf I	$\beta$ Ava II	3' $\beta$ HpaI	3' $\beta$ BamHI
I	+	-	-	+	+	+	-	+
II	-	-	-	+	+	+	-	+
III	-	-	-	-	+	+	-	+

QUADRO 5 - HAPLÓTIPOS DA GLOBINA  $\beta^C$   
FONTE: Boehm *et al.* (1985)

Powars *et al.* (2002) utilizaram as enzimas de restrição HindIII para  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$ ; HincII para o sítio  $\phi\beta$  e 3'  $\phi\beta$  e Hinf I para 5' $\beta$ , para a determinação dos haplótipos da globina  $\beta^S$  e o haplótipo  $\beta^C$  mais comum (+---++) foi designado  $C^I$ , conforme Boehm, 1985. Os pacientes SC com haplótipo  $\beta^S\beta^{CI}$  apresentaram menor incidência de retinopatia (33% vs 67%  $p=0,049$ ) do que o observado em pacientes que herdaram o haplótipo não  $\beta^{CI}$ , com diferença no início da doença em média aos 29 anos, no grupo  $\beta^S\beta^{CI}$  e aos 21 anos, no grupo  $\beta^S$  não  $\beta^{CI}$ .

## 2.10 POLIMORFISMOS NO GRUPAMENTO DA GLOBINA $\beta$ E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A substituição C-T na posição -158 do gene da  $\gamma^G$  (referida como o polimorfismo XmnI- $\gamma$ ) é uma sequência variante comum em todos os grupos humanos, numa frequência de 0,32 a 0,35. Sob condições de estresse hematopoético, como na talassemia *major* ou na doença falciforme, a presença do polimorfismo XmnI- $\gamma^G$ , detectável pela enzima de restrição XmnI, favorece a produção de HbF (LABIE *et al.*, 1985b). A presença desse polimorfismo nos pacientes com doença falciforme, com maior concentração de HbF, torna os sintomas clínicos mais brandos (GUPTA *et al.*; 2008; EL-HAZMI; AL-HAZMI, WARSY, 2011; PANDEY *et al.*, 2012).

O polimorfismo XmnI, situado a 5' $\gamma^G$  do gene da globina  $\beta$  está fortemente associado à elevada expressão do gene  $\gamma^G$ , resultando em alta concentração de HbF, nos haplótipos SENEGAL e ARABE-INDIANO (NAGEL *et al.*, 1985; KUZOLIK *et al.*, 1987). Na Argélia, o sítio de restrição XmnI está associado a alta proporção de  $\gamma^G$ , em relação à  $\gamma^A$ , nos pacientes talassêmicos  $\beta$  analisados (LABIE *et al.*; 1985b).

Os dois tipos de cadeias  $\gamma$  ( $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ) da HbF diferem, na posição 136, por um aminoácido (glicina e alanina) e são produzidos pelos genes intimamente ligados do *cluster* do gene da globina  $\beta$  (PANDEY *et al.*, 2012).

As regiões 5' flanqueadoras dos genes  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  da globina  $\beta$  são idênticas em 471 pares de bases 5' para o *cap site* (região onde se inicia a transcrição), com exceção de 6 pares de bases agrupados na região -271 a -398 pb. A diferença nessa região potencializa a mudança na relação  $\gamma^G/\gamma^A$  e os níveis de HbF (MONTH *et al.*, 1990).

Antonarakis *et al.*, 1982, encontraram três sítios polimórficos HincII no grupamento do gene da globina  $\beta$ : um na região 5' para o gene da globina  $\epsilon$  e dois entre os genes da  $\gamma^A$  e  $\delta$  globina, que estão situados no pseudogene  $\phi\beta$  e 3'. Um segmento contendo 619 pares de base na região do gene  $\epsilon$  pode ser amplificado e o sítio polimórfico  $\epsilon$ , reconhecido pela enzima HincII, permite a diferenciação entre os haplótipos falciformes e talassêmicos (GUERREIRO *et al.*, 1992).

O gene da globina  $\epsilon$  tem expressão na fase embrionária. Duas cadeias  $\epsilon$  com duas cadeias zeta (que originarão duas cadeias  $\alpha$ ), formarão a Hb Gower I. Duas cadeias  $\epsilon$  com duas cadeias  $\alpha$  formarão a Hb embrionária Gower II que posteriormente será substituída pela HbF e pela HbA do adulto (Figura 2) (HBE1 HEMOGLOBIN, EPSILON 1, 2011).

Kohen, Philippe e Godet (1982) encontraram um sítio Hinf I, localizado 1 Kb 5' para o gene da globina  $\beta$ , presente em clones de talassemia  $\beta^0$ , mas ausente em clones normais. Este sítio do gene da globina  $\beta$  é polimórfico mas sua presença não é específica dos genes da talassemia  $\beta$ , embora seja relativamente frequente na população mediterrânea.

Em 28 alelos examinados, os autores encontraram este sítio em oito pacientes talassêmicos e em 11 indivíduos com o gene da globina  $\beta$  normal. Assim, a sua presença não é específica da talassemia  $\beta$  ao contrário do sítio BamHI que frequentemente está associado ao gene  $\beta^0$  na Sardenha e com os genes falciformes nos negros e argelianos. Por isso, a sua presença auxilia na definição dos haplótipos associados com mutações  $\beta$  talassêmicas específicas (ORKIN *et al.*, 1982).

Os sítios polimórficos Avall e BamHI compreendem o grupamento 3' de polimorfismos da globina  $\beta$ . A enzima Avall digere a sequência 5' G▼G (T/A) CC 3' sendo esta sequência ausente no cromossomo  $\beta^A$  (ANTONARAKIS *et al.*, 1982) e a enzima BamHI digere a sequência 5' G▼GATCC3' (Thermo Scientific - bula), fora do grupamento da globina  $\beta$ .



## 2.11 A BIOLOGIA MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DA HbS

O DNA extraído do sangue total ou do sangue coletado em papel filtro e seco, é amplificado pela reação de cadeia em polimerase, conforme Saiki *et al.* (1985), para posterior análise de restrição. Jinks *et al.* testaram o sangue seco, coletado em papel filtro Schleicher and Schuell, utilizado na triagem neonatal, em picote de um disco de sangue seco de 6 mm de diâmetro (JINKS *et al.*, 1989). Lin *et al.* (2005), também testaram o DNA nas mesmas condições de Jinks *et al.* De um picote de sangue seco de 4,8mm de diâmetro, extraiu-se em média 0,5ng/uL de DNA (LIN *et al.*; 2005).

A coleta do sangue em papel filtro é uma técnica consagrada nos programas de triagem neonatal em todo o mundo para o diagnóstico precoce de doenças metabólicas e hemoglobinopatias de recém-nascidos. A extração de DNA do sangue seco coletado em papel filtro é eficiente para a genotipagem da globina  $\beta$ . Apresenta vantagens quanto ao transporte, armazenamento e conservação da amostra. O sangue coletado em papel filtro e seco possibilita o envio das amostras pelo correio (LIN *et al.*, 2005), não sendo necessário o deslocamento do paciente até o laboratório.

Com apenas uma picada no dedo ou calcanhar conforme a idade do paciente, com lanceta estéril, pode-se pingar diretamente de 3 a 5 gotas de sangue no papel filtro, secando-as à temperatura ambiente (DOMINGOS; OLIVEIRA; WITTIG, 2013), sendo esta quantidade suficiente para a realização dos testes. Para a obtenção de DNA, pode-se também retirar estas gotas de sangue do tubo contendo EDTA, quando da coleta para exames laboratoriais. A heparina pode interferir na amplificação do DNA, não se recomendando o uso do sangue quando for coletado com este anticoagulante (AL-SOUD; RADSTROM, 2001).

Conservando-se em geladeira a 4°C, em recipiente fechado, o sangue coletado em papel filtro mantém o material genético adequado para análise por um longo período de tempo.

### 2.11.1 Amplificação do DNA

Para o diagnóstico das hemoglobinopatias, existem várias técnicas para a amplificação de regiões do DNA: oligonucleotídeo alelo-específico; hibridização ou análise *dot-blot*; *dot-blot* de análise reversa; *priming* alelo-específico, sistema de amplificação da mutação refratária (ARMS), análise por enzimas de restrição, análise de restrição com amplificação criada, PCR mutagenicamente separada e PCR-*gap*. As técnicas baseadas em PCR são úteis para identificar mutações previamente conhecidas. Entretanto cada uma delas tem suas próprias limitações. Porém, é desejável que o laboratório de diagnóstico de DNA tenha pelo menos 1 método alternativo para detectar cada mutação, ou seja, deve haver um teste para confirmação (RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007).

A PCR é uma técnica utilizada para a amplificação enzimática *in vitro* de uma sequência específica de DNA visando a produção de milhões de cópias dessa sequência em um tubo de ensaio. É baseada no uso da enzima DNA polimerase, para copiar um molde de DNA em ciclos repetidos de replicação (ALBERTS *et al.*, 2006). Foi descrita por Kary Mullis *et al.*, no final dos anos 80 (FARAH, 2007).

Mesmo no século XXI, ainda é uma técnica utilizada para a análise do DNA de hemoglobinopatias (SAIKI *et al.*, 1985). Uma fita simples de DNA é usada como molde para sintetizar novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA polimerase, que tem a capacidade de adicionar nucleotídeos presentes na reação de acordo com a fita-molde. Porém a enzima necessita de um "ponto de início", que é fornecido por um oligonucleotídeo iniciador, curto, chamado de *primer*, que se hibridiza, isto é, anela-se à fita-molde simples. Estes *primers* são oligonucleotídeos sintéticos que primeiramente são desenhados pelo pesquisador como um elemento iniciador da replicação do DNA em cada fita do DNA dupla-fita original, e são sintetizados quimicamente (ALBERTS *et al.*, 2006; FARAH, 2007).

Sutton, Bouhassira e Nagel publicaram em 1989, a aplicação da técnica da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação de polimorfismos no grupamento da globina  $\beta$  para a análise dos seus haplótipos. Os fragmentos amplificados de DNA, contendo os sítios conhecidos, de 6 a 9 sítios polimórficos ao longo do *cluster* do gene da globina  $\beta$ , são digeridos por enzimas de restrição, separados em gel por eletroforese, corados pelo brometo de etídio e visualizados com luz ultra-violeta. Esta técnica apresenta vantagens sobre a técnica da hibridização, anteriormente usada como: a possibilidade de visualizar os fragmentos pelo brometo de etídio elimina a necessidade de transferência do DNA ao filtro de nitrocelulose, para posterior hibridização com sondas marcadas com radioatividade; a amplificação é completada em 3 a 5 horas dependendo das condições de PCR utilizadas. A incubação para a atividade da enzima de restrição pode ser realizada *overnight* (de 12 a 15 horas) e a separação dos fragmentos por eletroforese pode ser feita no dia seguinte. Toda a técnica é realizada em dois a três dias, tempo que é inferior aos seis a 10 dias da técnica da hibridização; além disso, como se usa pequena quantidade de DNA, necessita-se de pouca enzima de restrição (SUTTON; BOUHASSIRA. NAGEL, 1989).

No final do processo, o DNA amplificado pode ser observado em eletroforese de gel de agarose ou poliacrilamida como uma banda única, correspondente ao tamanho da sequência amplificada, que é identificada por quilobases. Entretanto, o fato de a banda observada no gel apresentar o tamanho esperado não garante que o fragmento amplificado seja o correto. A confirmação da identificação do fragmento amplificado pode ser feita por *Southern blotting* e hibridização por sonda complementar. A hibridização positiva indica que o fragmento obtido é o desejado (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006).

Basicamente, a PCR consiste de três etapas: desnaturação do DNA, que ocorre em dois estágios a 94°C (UHLMANN *et al.*, 1998). Inicialmente, os dois filamentos de DNA são parcialmente desenrolados com quebra das pontes de hidrogênio mas permanecem unidos pelo menos por um segmento curto da estrutura helicoidal dupla, com algumas bases complementares ainda conectadas. O segmento desenrolado de cada filamento assume conformações que mudam ao acaso.

No segundo estágio, os dois filamentos tornam-se completamente separados. Se forem rapidamente resfriados nesta etapa, cada filamento duplo livre volta por si mesmo a formar segmentos curtos, helicoidais duplos imperfeitos na tentativa de retornar à posição dupla, que é a forma onde estão com a menor energia livre. Entretanto, se as fitas se separarem completamente, a renaturação é muito mais lenta (LEHNINGHER, 1977), por isso, a desnaturação inicial geralmente ocorre a 94°C por 5 minutos porém a desnaturação dentro do ciclo é mais rápida, variando de 30 a 15 segundos. Em seguida, ocorre o anelamento dos *primers*, que são os fragmentos complementares ao DNA onde se encontra a sequência-alvo, que normalmente ocorre entre 45 a 72°C (30-65°C) e a última fase de extensão (em torno de 72°C - 2 a 5 minutos) que permite que a Taq polimerase adicione os desoxirribonucleotídeos (dntps), segundo a fita-molde ao final dos *primers*, criando assim uma nova sequência de DNA. Este processo se repete em torno de 35 vezes, para se obter milhões de cópias do DNA-alvo.

A obtenção de DNA de boa qualidade, dependerá de fatores como: quantidade inicial de DNA (número de leucócitos), a qualidade do DNA a ser amplificado, a eficiência do *primer* desenhado, e da otimização da cinética da PCR (UHLMANN *et al.*, 1998). Outros fatores podem influenciar o sucesso da amplificação do DNA. O tampão contendo KCl reduz a repulsão entre as 2 fitas de DNA, pois o K<sup>+</sup> se liga à carga negativa do DNA, mantendo-as unidas. O MgCl<sub>2</sub> é essencial para o bom desempenho da PCR, pois o Mg<sup>+2</sup> se liga ao sítio catalítico da Taq polimerase, regulando a sua atividade. A concentração de uso varia de 1,5mM a 2,0 mM.

As etapas de desnaturação, anelamento e extensão são realizadas automaticamente pelo termociclador. Cada par de *primers* desenhado segue uma programação específica. A temperatura média de anelamento (T<sub>ann</sub>) é uma das etapas essenciais para o bom desenvolvimento da amplificação. Para a determinação da T<sub>ann</sub>, pode-se utilizar o sistema de gradiente de temperatura como o Master Cycler (Eppendorf) ou definir a temperatura de anelamento através de cálculo matemático. A ciclagem é outro fator que pode interferir no sucesso da PCR. Usualmente são realizados de 30 a 35 ciclos para se obter boa amplificação. O excesso de ciclos pode resultar na geração de bandas inespecíficas. Estas podem ser reduzidas, diminuindo-se o tempo de desnaturação inicial por exemplo de 30" para 15" a 20" (BIORAD, 2014; PHONEUTRIA, 2014).

### 2.11.2 Enzimas de Restrição

As enzimas de restrição, também conhecidas como endonucleases, são naturalmente produzidas por algumas bactérias para protegê-las contra a infecção viral e cortam a molécula do DNA em sítios específicos no seu interior (FARAH, 2007; RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007), em contraposição às exonucleases, que digerem as pontas das moléculas (FARAH, 2007).

Cada endonuclease reconhece uma sequência específica de quatro nucleotídeos no DNA. Esta sequência, que também ocorre no genoma da própria bactéria, está protegida da clivagem por metilação de um resíduo de A ou C. Em DNAs estranhos àquela célula, estas sequências não estão metiladas, sendo então clivadas pelas enzimas de restrição. Grande número dessas enzimas vem sendo purificadas de várias espécies de bactérias e disponíveis comercialmente. São classificadas em 3 grupos. Os tipos I e III possuem atividades de modificação (metilação) e atividade de restrição (corte) dependente de ATP, na mesma proteína. As enzimas do tipo III cortam o DNA no sítio de reconhecimento e se dissociam do substrato. O tipo I liga-se à sequência de reconhecimento e corta os sítios ao acaso quando o DNA se prende novamente à enzima ligada. As enzimas do tipo II, amplamente utilizadas, são sistemas binários que consistem de endonucleases de restrição, que cortam uma sequência específica de nucleotídeos, e uma metilase separada, que modifica a mesma sequência de reconhecimento (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*) ou RFLP é o método que utiliza enzimas de restrição para a detecção de mutações e polimorfismos genéticos (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006). A técnica depende da propriedade da enzima de restrição em fragmentar o DNA, em um sítio específico de reconhecimento que, na eletroforese, será separado de acordo com o tamanho destes fragmentos (FARAH, 2007; GUPTA *et al.*, 2008). De forma mais específica, pode-se determinar a sequência completa de bases do fragmento amplificado pelo método de sequenciamento do DNA, cuja desvantagem atual ainda é o custo. Assim, antes de se recorrer ao sequenciamento, os resultados questionáveis ou duvidosos devem ser confirmados por repetição dos testes. A técnica das enzimas de restrição é relativamente robusta, simples e barata, que possibilita resultados inequívocos, sendo ainda inestimável ferramenta para o diagnóstico molecular. A especificidade do método é de 100% quando a enzima de restrição apropriada é utilizada (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006).

### 2.11.3 Identificação e leitura do DNA

Na separação por eletroforese que ocorre pela diferença de cargas e massas, as diferentes moléculas e partículas da solução irão migrar, a diferentes velocidades, em direção a um eletrodo carregado por carga oposta, e serão separadas em frações isoladas. Durante este processo, o DNA está em meio gelatinoso formado pelo gel de agarose ou poliacrilamida. Quando submetido a um campo elétrico, em pH neutro, as moléculas de DNA são atraídas para o pólo positivo e repelidas pelo pólo negativo. A velocidade de migração depende dos valores de pK dos grupamentos carregados e do tamanho da molécula ou partícula. Esta velocidade é influenciada pelo tipo, concentração e pH do tampão, além da temperatura, força do campo elétrico e também pela natureza do suporte material (WESTERMEIER, 2001).

A eletroforese em meio de agarose ou poliacrilamida é o método padrão para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA. Aqueles de tamanhos menores passarão pela matriz do gel com maior facilidade do que uma molécula maior havendo, portanto, migração diferenciada dos fragmentos, que é inversamente proporcional ao tamanho da molécula. Essa matriz, que pode ser de agarose, poliacrilamida ou outros, vai provocar uma resistência na passagem dos fragmentos. A matriz de agarose (material semelhante a uma gelatina purificada) possui poros que permitem a separação de fragmentos que variam de 200 a 50.000 pb, desde que se ajuste a concentração do gel. A configuração do gel de agarose para corrida elétrica horizontal possui menor capacidade de separação do que a poliacrilamida mas possui maior amplitude de separação.

Se a concentração da agarose for muito baixa, por exemplo, de 0,3%, a resistência gerada para a migração da molécula de DNA será pequena e assim moléculas de tamanhos maiores poderão ser eficientemente separadas. Mas, para uma separação satisfatória de fragmentos menores, é necessário aumentar-se a concentração da agarose no gel, algo em torno de 2,0% ou mais.

A escolha entre o gel de agarose ou poliacrilamida dependerá do tamanho dos fragmentos a serem separados. A poliacrilamida separa melhor fragmentos menores, de 5 a 500 pb, e pode diferenciar fragmentos de apenas 1 pb. A desvantagem é a dificuldade no preparo e a corrida elétrica que possui configuração de campo vertical.

A mobilidade eletroforética do DNA é afetada pela sua composição e pela força iônica do tampão. Na ausência de íons, que pode ocorrer em situações em que se esquece de se adicionar o tampão, por exemplo, a condutância elétrica é mínima e o DNA migra muito lentamente. Por outro lado, se um tampão de grande força iônica for usado (por exemplo, de 10x) a condutância elétrica será muito eficiente e significativa quantidade de calor será gerado. Em casos extremos o gel derrete e o DNA se desnatura. Historicamente, o tampão mais utilizado é o tris-acetato-EDTA (TAE), porém a sua capacidade tamponante é um pouco baixa, apresentando algumas limitações. O tampão tris-borato-EDTA (TBE), por sua vez, é um pouco mais caro, porém a sua capacidade tamponante é melhor. A posição do DNA dentro do gel pode ser diretamente observada por marcação com pequenas concentrações de fluorescência proporcionada pelo brometo de etídio, que se intercalam entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA, possibilitando a visualização dos fragmentos presentes no gel, sob luz ultra-violeta. Bandas contendo quantidades variáveis de DNA como 1-10 ng podem ser vistas por exame direto do gel em ultravioleta. Além disso, o DNA pode ser recuperado do gel e usado para outras situações de clonagem (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

#### **2.11.4 Técnica PCR - RFLP**

Para a identificação dos haplótipos, realiza-se a amplificação da região do DNA contendo a mutação ou o "alvo" por PCR e o produto desta amplificação é digerido por enzimas de restrição, segundo a técnica conhecida por RFLP (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989). Se houver o reconhecimento do sítio de restrição, serão gerados dois ou mais fragmentos menores que o original, indicando que o sítio é susceptível à ação da enzima, isto é, há corte do fragmento do DNA, representada pelo sinal "+". Se não houver o reconhecimento do sítio ou a digestão, o tamanho do fragmento não se altera e é representado pelo sinal " - ", ou seja, não ocorre o corte da sequência (NAOUM; NAOUM, 2004; LIU *et al.*, 2009). Como cada indivíduo herda um gene de cadeia  $\beta$  de cada um dos pais no modelo autossômico recessivo de Mendel (SAMARAH.; ATHANASIOU-METAXA, VAVATSKI-CHRISTAKI, 2007), o resultado obtido pela técnica RFLP é bialélico (CRAWFORD; NICKERSON, 2005; LIU *et al.*, 2009).

Se ambos os alelos forem susceptíveis à ação da enzima então a representação é "+/+" ou C/C (cortado/cortado) caracterizando a homozigose; por outro lado, se apenas um dos alelos for digerido a representação é "+/-" (cortado/não cortado) demonstrando a heterozigose. Se não houver digestão a representação é -/- (GILMAN; HUISMAN, 1984; HANCHARD *et al.*, 2007). Assim só é possível, um dos 3 genótipos: (-/-; -/+ ou +/+). Entretanto, a digestão parcial ou incompleta pela enzima de restrição pode resultar em falsos positivos ou negativos; por isso, é essencial a inclusão de controles positivos (cortado) e negativos (não cortados) ou heterozigotos (fragmento cortado e não cortado na mesma amostra) junto com as amostras-testes (RAHIM; KAEIKHAEI; MOHAMMAD, 2007).



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de estudo transversal, descritivo, qualitativo, quantitativo e analítico para a definição dos haplótipos, sua frequência e distribuição geográfica; associativo, na avaliação da interferência dos haplótipos sobre o quadro clínico; observacional e analítico, quanto à evolução clínica.

#### **3.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO**

O estudo foi realizado com pacientes com diagnóstico de DF, em tratamento e acompanhamento no ambulatório de Hematopediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e/ou Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Paraná (HEMEPAR), em Curitiba, de março de 2011 a junho de 2015.

As genotipagens das amostras dos pacientes foram realizadas no Centro de Genética e Pesquisa Molecular do Câncer da Criança (CEGEMPAC).

#### **3.3 POPULAÇÃO FONTE**

Baseando-se nos registros de pacientes com DF do HEMEPAR, a população fonte foi estimada em 400 pacientes, em tratamento nos diversos hospitais do estado.

#### **3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Pacientes com a HbS em homozigose - doença SS ou em heterozigose - doença SC e S-talassemia  $\beta$ , atendidos no ambulatório de Hematopediatria do HC-UFPR e/ou no HEMEPAR.

### **3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes que se recusaram ou tiveram a participação não autorizada pelos seus responsáveis.

### **3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

A população de estudo foi composta de 194 pacientes com doenças falciformes, residentes no estado do Paraná que realizam o tratamento e acompanhamento em Curitiba, no Hospital de Clínicas ou no HEMEPAR. A coleta da amostra de sangue foi consecutiva, sendo 122 pacientes do HC-UFPR e 72 do HEMEPAR. Do total dos pacientes participantes, 100 tem o diagnóstico de anemia falciforme; 45 de S-talassemia  $\beta$  e 49 de doença SC.

### **3.7 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM**

A amostra foi não probabilística, por conveniência, sendo a triagem realizada conforme chegada aos ambulatorios.

Previamente ao início do estudo, os pacientes foram sensibilizados com um cartaz (Apêndice 1), exposto nas salas de espera dos respectivos ambulatorios, para adesão ao projeto de pesquisa.

Os pacientes foram informados pela equipe médica do ambulatório de hematopediatria do HC-UFPR ou pela Assistente Social do HEMEPAR, quanto aos objetivos de suas participações. Após identificado nos registros, cada paciente ou o responsável legal autorizou a coleta do sangue através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE (Anexo 2). Nas crianças de 0 a 13 anos e 11 meses o Termo foi preenchido pelos pais ou responsáveis e pelo próprio paciente se idade igual ou superior a 18 anos. Aos pacientes com idade entre 14 a 17 anos e 11 meses, também foi solicitado Termo de Assentimento (TA) ao próprio paciente (Anexo 3).

Para se determinar o grau de confiabilidade das amostras analisadas, com erro amostral de 5% e nível de confiança de 95%; onde a população de hemoglobinopatias falciformes no estado do Paraná N=400 pacientes e considerando-se que percentual máximo de haplótipo CAR (tipo mais grave) seja de 20% conforme equação abaixo, concluiu-se que a amostra deveria ter pelo menos, 153 pacientes testados (SANTOS, 2014).

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

n - amostra calculada - número de indivíduos da amostra

N - população - número de indivíduos da população

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança

p - verdadeira probabilidade do evento

e - erro amostral

### 3.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Por ser estudo descritivo, não há variáveis dependentes. As variáveis independentes estudadas foram as hemoglobinas S, C e a talassemia  $\beta$  e seus respectivos haplótipos.

As variáveis quantitativas analisadas foram: HbF; do hemograma foram avaliadas a contagem de hemácias, o valor de hemoglobina (Hb), o volume corpuscular médio (VCM), número de leucócitos e plaquetas, além da contagem de reticulócitos.

Também foram avaliadas as variáveis qualitativas, referentes à associação de eventos clínicos: STA, sequestro esplênico, AVC, crises de dor, dactilite, internações por infecção, alterações cardíacas, infecção urinária.

Foi realizado o controle das variáveis interferentes como a idade e o sexo.

### 3.9 PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Os pacientes que participaram deste estudo possuíam o diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias realizado nos laboratórios do HC e do HEMEPAR, de acordo com as rotinas de atendimento pelos métodos de eletroforese alcalina em acetato de celulose, pesquisa de HbA<sub>2</sub> pelo método de eluição e HbF pelo método Singer-Chernoff, álcali-resistente.

Pacientes com HbS, cujo hemograma apresentasse VCM baixo e níveis de HbA<sub>2</sub> maiores que 3,5% foram classificados como interação S-talassemia  $\beta$ .

A distribuição dos casos de HbSS, Hb S-talassemia  $\beta$  e doença SC e seus genótipos foram plotados no mapa geográfico do Estado do Paraná.

Quanto à evolução clínica, foram analisados 122 pacientes acompanhados no ambulatório de Hematopediatria do HC-UFPR, sendo 52 com diagnóstico de anemia falciforme; 28, de S-talassemia  $\beta$  e 42, de doença SC.

As amostras de sangue foram obtidas por ocasião da coleta de exames de rotina. Do sangue coletado com o anticoagulante EDTA ou sem anticoagulante, foram retiradas de 3 a 4 gotas absorvidas em papel filtro, seco à temperatura ambiente, acondicionado em saco plástico e armazenado à temperatura de 4°C, por até 3 anos, até a conclusão de cada caso. Pacientes que foram transfundidos tiveram a coleta para a genotipagem adiada por pelo menos 3 meses após a transfusão e daqueles com resultados duvidosos por possível transfusão não registrada, foi repetida nova coleta para análise.

Os pacientes do HEMEPAR, por fazerem uso regular da hidroxiuréia, foram genotipados porém, não foram analisados quanto à evolução clínica.

Para a caracterização dos haplótipos da HbS foram genotipados 100 pacientes SS, 45 pacientes S $\beta$ ; 49 pacientes SC totalizando 194 pacientes. Foram pesquisados 6 sítios de restrição do grupamento do gene da globina  $\beta$ : 5' $\gamma^G$ ,  $\gamma^G$   $\gamma^A$ ,  $\phi\beta$ , 3'  $\phi\beta$  e 5' $\beta$ .

Os pacientes com diagnóstico de doença SC ou S $\beta$  também foram genotipados para os haplótipos da HbC e talassemia  $\beta$ . Além dos 6 sítios de restrição anteriormente citados foram incluídos os sítios  $\epsilon$ ,  $\beta$  e 3' $\beta$ .

Durante as consultas médicas desses pacientes são registrados dados padronizados conforme se verifica no Anexo 4. Exames laboratoriais e complementares seguem o programa preconizado pelo Ministério da Saúde. Para análise dos valores de HbF, foram selecionados aqueles obtidos após 1 ano de vida.

A Figura 9 apresenta a distribuição numérica de indivíduos analisados, seus diagnósticos, procedência quanto ao local de tratamento e análise realizada.

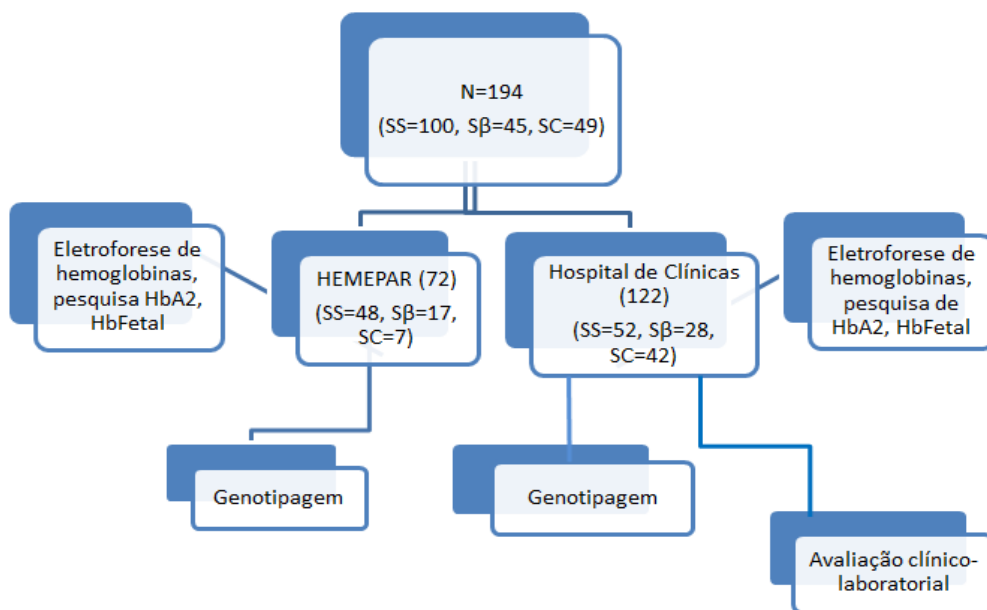


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME GENOTIPADOS E AVALIADOS QUANTO À EVOLUÇÃO CLÍNICA

FONTE: A autora (2015)

### 3.10 TABULAÇÃO E GERENCIAMENTO DE DADOS

Os dados obtidos foram sendo alimentados em planilha Excel, tanto para os resultados das enzimas de restrição, quanto os dados clínico-laboratoriais. Posteriormente, foram tabulados para o tratamento estatístico.

Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente foram coletados de registros, contendo: número de registro, nome, data de nascimento, gênero, cidade de origem e Regional de Saúde além dos resultados de 4 enzimas de restrição sobre 6 regiões do grupamento da globina  $\beta$  para a definição dos haplotipos da globina  $\beta^S$  e 7 enzimas sobre 9 regiões do grupamento da globina  $\beta^C$  e no grupamento da talassemia  $\beta$ . As manifestações clínicas coletadas foram: crises dolorosas, dactilite, AVC, STA, alterações cardíacas a partir dos exames de ecocardiografia, pneumonia, infecção urinária e sequestro esplênico.

Para a definição do fenótipo bioquímico dos pacientes, foram analisados os resultados laboratoriais de eletroforese de hemoglobinas, dosagem de HbA<sub>2</sub>, e HbF. Além do tipo de hemoglobina, também foram analisados o índice eritrocitário VCM, a contagem de reticulócitos e eletroforese alcalina e ácida de hemoglobinas; a eletroforese por focalização isoelétrica (FIE) e cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC). Foram também registrados os valores de HbA<sub>2</sub> e HbF dos pais, para auxiliar na definição do diagnóstico.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados clínicos e laboratoriais (genotipagem) foi realizado utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. A frequência dos haplótipos/genótipo em relação ao gênero e idade foi realizada utilizando a estatística descritiva.

As variáveis foram avaliadas quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas foram descritas em número e percentagem. Para as variáveis normais, foi utilizado o teste ANOVA e para as não normais utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar variáveis paramétricas quantitativas entre dois grupos, foi utilizado o teste *t*-Student. O teste do qui-quadrado foi aplicado para evidenciar a possível relação entre o genótipo com os sinais e sintomas clínicos.

Para a análise da distribuição dos eventos clínicos de acordo com a idade e tipo de doença falciforme foi utilizado o teste binomial de uma ou duas proporções. Do mesmo modo, a comparação entre as frequências dos haplótipos/genótipos dos artigos publicados em relação ao presente trabalho foram realizadas pelo teste binomial ou pelo teste *t*-Student.

### **3.12 ÉTICA EM PESQUISA**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas, em 17 de fevereiro de 2011, sob n.º CAAE 0295.0.208.000-10 e n.º registro no CEP: 2369.263/2010-11 (Anexo 1).

### **3.13 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA**

A monitorização da pesquisa ocorreu pela concordância em participar do estudo, reconhecido pela leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo próprio paciente, se maior de 18 anos ou pelos pais ou responsáveis quando o paciente era menor de idade até 17 anos e 11 meses. As crianças em idade escolar, a partir dos 14 anos também assinaram o Termo de Assentimento, além do TCLE assinado pelos pais. No andamento da pesquisa, foi retirada a amostra de uma criança por solicitação de familiar.

Os resultados obtidos foram analisados periodicamente com a intenção de validar os diagnósticos previamente estabelecidos.

### 3.14 FOMENTO PARA A PESQUISA, PROFISSIONAIS E SERVIÇOS ENVOLVIDOS

Esta pesquisa teve o apoio financeiro da Fundação Araucária pelo Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS-2008/2009- 2ª edição chamada de projetos nº 08/2010 .

Os profissionais envolvidos além da pesquisadora, que é farmacêutica - bioquímica e sua orientadora que é médica hemato-onco-pediatra foram: médicos efetivos e residentes, enfermeiros, biólogos, assistentes sociais e secretárias entre outros. Os serviços envolvidos neste estudo foram o HC-UFPR, HEMEPAR e CEGEMPAC.

### 3.15 TÉCNICAS LABORATORIAIS - DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DA GLOBINA $\beta^S$ , GLOBINA $\beta^C$ E S-TALASSEMIA $\beta$

A determinação dos haplótipos da globina  $\beta^S$ , globina  $\beta^C$  e S-talassemia  $\beta$ , foi realizada pela amplificação por reação em cadeia da polimerase da região desejada, seguida pela digestão por enzimas de restrição.

Para a amplificação das regiões polimórficas do grupamento do gene da globina  $\beta^S$ , os *primers* (H0 a H10) utilizados foram baseados no artigo de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989).

Para as regiões polimórficas do grupamento do gene da globina  $\beta^A$  talassêmica foram utilizados os *primers* EF e ER para a amplificação da região  $\epsilon$ , reconhecidos pela enzima Hinc II com base no trabalho de Guerreiro *et al.* (1992). Para a amplificação da região  $\beta$ , no grupamento do gene da globina talassêmica  $\beta$  foram utilizados os *primers* F e R e o polimorfismo, identificado pela enzima Avall. Para a amplificação da região 3' $\beta$  (fora do grupamento) foram utilizados os primers 3'F, 3'R e o polimorfismo, reconhecido pelas enzima BamHI, de acordo com Orkin *et al.*, 1982. Estes 2 últimos sítios também foram utilizados para confirmar os haplótipos da HbC conforme Boehm (1985). A sequência de nucleotídeos a ser amplificada pelo conjunto de *primers* foi conferida no grupamento da  $\beta$  globina, da hemoglobina "Homo sapiens".<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/human>>. Acesso em: 09 maio 2012.



A sequência de início e final da região do grupamento em estudo foi localizada, dentro da sequência de nucleotídeos da globina  $\beta$ , através do n.º NCBI (Quadro 6). Utilizando-se a plataforma WORD, colocou-se a sequência do *primer* digitado, selecionando-se a sequência escolhida e através da ferramenta "localizar", encontrou-se o início e o fim das regiões a ser amplificada. Deve-se notar que a sequência do *primer* final deve ser complementar e reverso.

Posteriormente, localizou-se a sequência reconhecida pela enzima de restrição apropriada e conferindo-se os números de nucleotídeos (pb) de cada fragmento obtido.

Dentro da sequência delimitada do *primer* iniciador e final, localiza-se a sequência que é reconhecida pela enzima de restrição, que é o ponto onde haverá o corte, gerando 2 fragmentos de números de pares de bases. Estas etapas deverão ser realizadas, no início da pesquisa, antes da aquisição dos *primers*.

O Quadro 6 apresenta a composição nucleotídica dos *primers* utilizados.

PRIMERS 5' → 3' / 3' → 5'			NCBI ID:U01317	SÍTIO DE RESTRIÇÃO	TAMANHO FRAGMENTO PÓS- CLIVAGEM (pb)	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
Hbs	H0 H1	AAC TGT TGC TTT ATA GGA TTT T AGG AGC TTA TTG ATA ACC TCA G	33862	5' $\gamma^G$	650=450+200	XmnI
	H2 H3	AAG TGT GGA GTG TGC ACA TGA TGC TGC TAA TGC TTC ATT ACA A	36203 35422	$\gamma^G$	780=430+340+10	Hind III
	H3 H4	TGC TGC TAA TGC TTC ATT ACA A TAA ATG AGG AGC ATG CAC ACAC	35422 41119	$\gamma^A$	760=400+360	Hind III
	H5 H6	GAA CAG AAG TTG AGA TAG AGA ACT CAG TGG TCT TGT GGG CT	46426 47126	$\phi\beta$	701=360+340+1	HincII
	H7 H8	TCT GCA TTT GAC TCT GTT AGC GGA CCC TAA CTG ATA TAA CTA	49476 50089	3' $\phi\beta$	590=470+120	HincII
	H9 H10	CTA CGC TGA CCT CAT AAA TG CTA ATC TGC AAG AGT GTC T	60906 51291	5' $\beta$	380=240+140	Hinf I
$\beta$ -tal e HbC	BF BR	TCC TAA GCC AGT GCC AGA AG TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC	61976 62746	$\beta$	763=446+214+103	Ava II
	3'F 3'R	GCC CAC ATC ACC AAG GCA AT TGATGGCTAGTGATGATGAG	71728 72450	3' $\beta$	737=455+282	BamHI
$\beta$ -tal	EF ER	TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT CTT GAG AGC TTG CTA GTG ATT	18913 19511	$\epsilon$	619=435+184	HincII

QUADRO 6 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GRUPAMENTOS DA GLOBINA  $\beta$ .

FONTE: Sutton , Bouhassira e Nagel (1989); Guerreiro *et al.* (1992); Silva (2007), Bezerra (2007), Cabral (2010)

NOTA: NCBI- National Center for Biotechnology Information.

Após a amplificação para a determinação dos haplótipos do gene da globina  $\beta^S$ , foram pesquisados 6 sítios polimórficos, com o uso de 4 enzimas de restrição: XmnI, Hind III, HincII e HinfI (FERMENTAS®).

Estes sítios foram amplificados através de *primers* específicos baseados no artigo de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989), e confirmados pela análise do grupamento do gene da globina  $\beta$ .

Na padronização da técnica, como controle inicial de trabalho foram utilizadas amostras de DNA de pacientes cujos haplótipos foram previamente identificados citados na dissertação de mestrado de Cabral (2010) do Rio Grande do Norte.

Posteriormente, os heterozigotos para cada uma das enzimas de restrição identificados pelo presente trabalho, foram utilizados como "controle heterozigoto". Para o controle normal ou "negativo" foram utilizadas amostras cujos resultados não sofreram a ação de enzimas na obtenção de fragmentos.

Para a identificação dos haplótipos da globina  $\beta^C$  e cadeia talassêmica  $\beta$ , além dos sítios acima mencionados, foram testados os sítios  $\epsilon$ ,  $\beta$ , e  $3'\beta$  conforme Guerreiro *et al.* (1992); Boehm *et al.* (1985) e Orkin *et al.* (1982), utilizando-se as enzimas HincII, Ava II e BamHI, respectivamente.

Para os pacientes com HbS em homozigose, cujas genotipagens foram sugestivas para S-talassemia  $\beta$  ou cujos haplótipos foram definidos como "atípicos", os sítios  $\epsilon$ ,  $\beta$ , e  $3'\beta$  também foram analisados, utilizando-se as enzimas HincII, Avall, BamHI.

O protocolo de trabalho para a identificação das regiões polimórficas no grupamento da globina  $\beta$  humana foi realizado em 4 etapas.

### 1.<sup>a</sup> Etapa - PCR

- 1) Montagem do protocolo de trabalho de acordo com o tamanho da cuba de eletroforese disponível e identificação de cada tubo ou placa.
- 2) Obtenção de dois picotes de 2mm de diâmetro do papel filtro com amostra de sangue seco, colocados em tubo Eppendorff com tampa para PCR ou em placa de 96 pocinhos com selante.
- 3) Lavagem dos picotes com solução MGM<sup>®</sup> ou MGM PLUS<sup>®</sup>, para a retirada do sangue seco e hemoglobina conforme orientação da bula.
- 4) Lavagem em duas etapas com água ultrapura: deixar 5 minutos na estufa a 60°C, por duas vezes. Se na segunda lavagem o picote já estiver com coloração amarelada, mostra que a hemoglobina foi quase toda retirada, pode-se fazer somente uma rinsagem rápida.
- 5) Secagem dos picotes em estufa a 50°C- 60°C, conforme bula da solução MGM PLUS<sup>®</sup>.
- 6) Preparo do *Mix* (solução de trabalho para PCR específico para cada par de *primers* e dispensação de 25 µL nos tubos do item anterior, conforme Quadro 7 e Quadro 8 (ENDMEMO, 2012).
- 7) Incubação no termociclador para 35 ciclos, nos programas específicos para a amplificação da região onde se encontra o sítio de restrição, conforme apresentado no Quadro 9.
- 8) Ao término desta etapa, as amostras podem ser congeladas ou se partir imediatamente para a segunda etapa.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	SÍTIO DE RESTRIÇÃO/ENZIMA DE RESTRIÇÃO (µL)					
		5'γ <sup>G</sup> XmnI	γ <sup>G</sup> Hind III	γ <sup>A</sup> Hind III	φβ HincII	3'φβ HincII	5'β HinfI
Água ultrapura	--	19,425	19,85	19,35	19,85	19,85	19,45
Tampão 10x (Fermentas)	--	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5	2,0	2,5	2,0	2,0	2,5
Dntp	25mM	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
Primer F	100 uM	0,0625	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Primer R	100 uM	0,0625	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Taq polimerase	5U/ul	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
TOTAL		25					

QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DO *MIX* PARA PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES 5'γ<sup>G</sup>, γ<sup>G</sup>, γ<sup>A</sup>, φβ, 3'φβ, 5'β DO GRUPAMENTO DA GLOBINA β

FONTE: A autora

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO	SITIO RESTRIÇÃO/ENZIMA RESTRIÇÃO (μL)		
		ε HincII	β Ava II	3' β BamHI
Água ultrapura	--	19,34	20,0	19,4
Tampão 10x (Promega)	--	5,0	-	-
Tampão 10x (Thermo.Scientific)		-	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	0,125	2,0	2,5
Dntp	25mM	0,25	0,25	0,3
Primer F	100 uM	0,05	0,05	0,025
Primer R	100 uM	0,05	0,05	0,025
Taq polimerase	5U/μL	0,125	0,15	0,25
TOTAL		25		

QUADRO 8 - COMPOSIÇÃO DO *MIX* PARA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ε, β e 3'β DO GRUPAMENTO DA GLOBINA β.

FONTE: A autora

REGIÃO	DESNATURAÇÃO INICIAL		35 CICLOS						EXTENSÃO FINAL	
			Desnaturação		Anelamento		Extensão			
	Temp. (°C)	Tempo	Temp. (°C)	Tempo	Temp (°C)	Tempo	Temp. (°C)	Tempo	Temp. (°C)	Tempo
E	95	2'	94	1'	56	1'	72	2'	72	7'
5'γ <sup>G</sup>	94	5'	94	45"	60	45	72	90"	72	7'
γ <sup>G</sup>	94	5'	94	30"	55	1'	72	60"	72	7'
γ <sup>A</sup>	94	5'	94	30"	55	1'	72	60"	72	7'
Φβ	94	5'	94	30"	55	1'	72	60"	72	7'
3' φβ	94	5'	94	30"	55	1'	72	60"	72	7'
5'β	94	5'	94	1'	57	45"	72	90"	72	7'
B	95	2'	96	30"	54	1'	72	60"	72	7'
3'β	95	2'	96	30"	58	1'	72	60"	72	7'

QUADRO 9 - PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA

FONTE: A autora

NOTA: Os tempos e temperaturas devem ser normalizados para cada termociclador (Biorad-PCR troubleshooting application, EPPENDORF, PCR, 2014)

## 2.<sup>a</sup> Etapa - enzimas restrição

- 1) Preparo do *mix* (Quadro 10) com as enzimas de restrição e dispensação de 5μL nos tubos pós-PCR (que contém 25μL) para um volume final de 30μL.
- 2) Selagem ou fechamento hermético dos tubos que permanecerão em incubadora de hibridização a 37°C, por no mínimo 12 horas e no máximo 15 horas.

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO		
Água ultrapura	--	3,0
Tampão BSA	--	1,5
Enzima de restrição	--	0,5
Volume final	5,0μL	

QUADRO 10 - *MIX* DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA DIGESTÃO ENZIMÁTICA SOBRE O PRODUTO DA PCR

Fonte: a autora (2015)

### **3.<sup>a</sup> Etapa - eletroforese**

- 1) Para a separação das bandas e identificação dos fragmentos, preparou-se gel de agarose a 1,5% dissolvido em 300 ml de solução TBE 1x em Erlenmeyer aquecido por 3-4 minutos em forno microondas até a completa dissolução do gel. Depois de ligeiramente resfriado, foram adicionados 15µL de brometo de etídio (AMRESCO<sup>®</sup>), homogeneizado e colocado na bandeja da cuba de eletroforese. Antes da solidificação do gel, foi colocado o pente na parte inicial da mesma, para formar os pocinhos onde serão depositados o DNA amplificado e tratado com as enzimas de restrição além dos controles, positivo e/ou negativo, o marcador de peso molecular (PM) de 100 pb além do tampão de carregamento (*loading buffer*). Após solidificado, o pente foi retirado e o gel, mergulhado na cuba contendo tampão TBE 1X.
- 2) A cada tubinho contendo 30µL do produto da restrição, foram adicionados 5µL de azul de bromofenol, para orientar a corrida na cuba de eletroforese. Foram colocados de 10 a 12 µL do produto da restrição em cada pocinho, conforme identificação dos tubos e protocolo. A separação dos fragmentos de DNA no gel ocorreu a 140 V por aproximadamente 90 minutos.
- 3) Para finalizar, procedeu-se à revelação em transiluminador e fotodocumentação com filtro amarelo. A imagem foi salva em computador como JPEG para posterior leitura e interpretação (FARAH, 2007).

### **4.<sup>a</sup> Etapa - Registro dos resultados em planilha e análise dos resultados**

As figuras numeradas de 10 a 18 ilustram o(s) produto(s) obtido(s) da digestão de cada enzima de restrição sobre cada região do DNA amplificado. A banda de maior peso molecular corresponde ao fragmento amplificado inteiro (sem digestão pela enzima de restrição). Os fragmentos de PM menores devem corresponder ao tamanho em número de pares de bases (pb) descrito no Quadro 6. O total de pares de bases dos fragmentos menores corresponde ao número de pares de bases do fragmento maior.

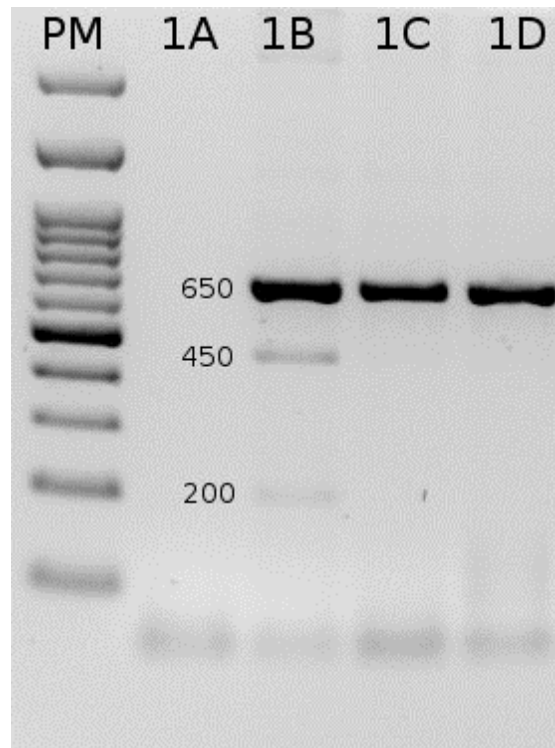


FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO 5' Y<sup>G</sup>

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco

1B - Controle heterozigoto NC/C

1C - Controle homozigoto negativo (NC/NC)

1D - Amostra NC/NC

Interpretação: Região 5' Y<sup>G</sup> XmnI = 650 = 450 + 200.

Cada banda do marcador de peso molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

A banda mais alta correspondendo a 650 pb; é o total da região amplificada do DNA. 450 e 200 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 650 pb.

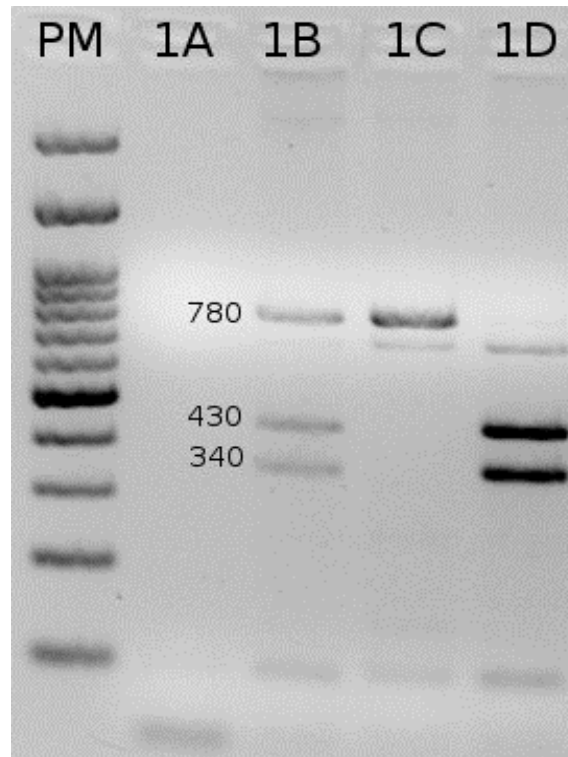


FIGURA 11 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO  $\gamma^G$

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco

1B - Controle heterozigoto (NC/C)

1C- Controle homozigoto negativo ( NC/NC)

1D - Amostra homozigoto positivo (C/C)

Interpretação: Região  $\gamma^G$  – Hind III =780=430+340+10.

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

A banda mais alta correspondendo a 780 pb é o total da região amplificada do DNA.

430 e 340 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 780 pb . A banda de 10 pb não é visível por esta técnica.

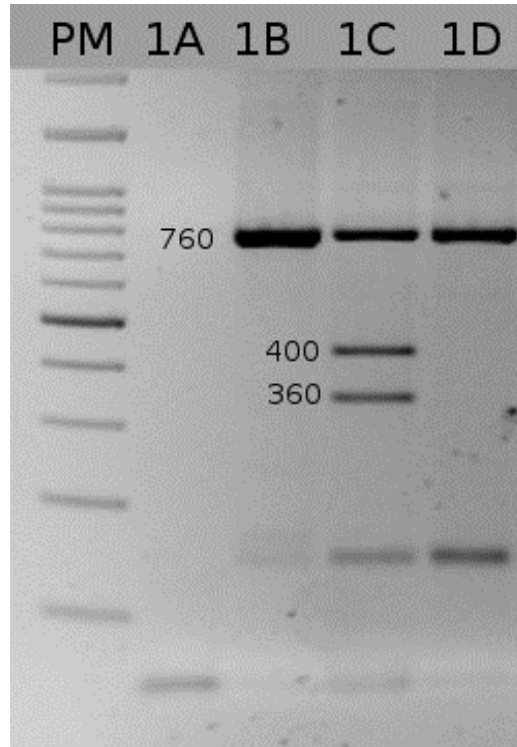


FIGURA 12 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO  $\gamma^A$

FONTE: A autora

#### NOTAS

PM - Marcador de peso molecular

1A- Controle branco;

1B- Controle homozigoto negativo (NC/NC)

1C - Controle heterozigoto NC/C

1D - Amostra homozigota negativa (NC/NC).

Interpretação: Região  $\gamma^A$  Hind III =760=400+360.

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

1B - A banda mais alta correspondendo a 760 pb é o total da região amplificada do DNA.

1C - 400 e 360 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 760 pb.



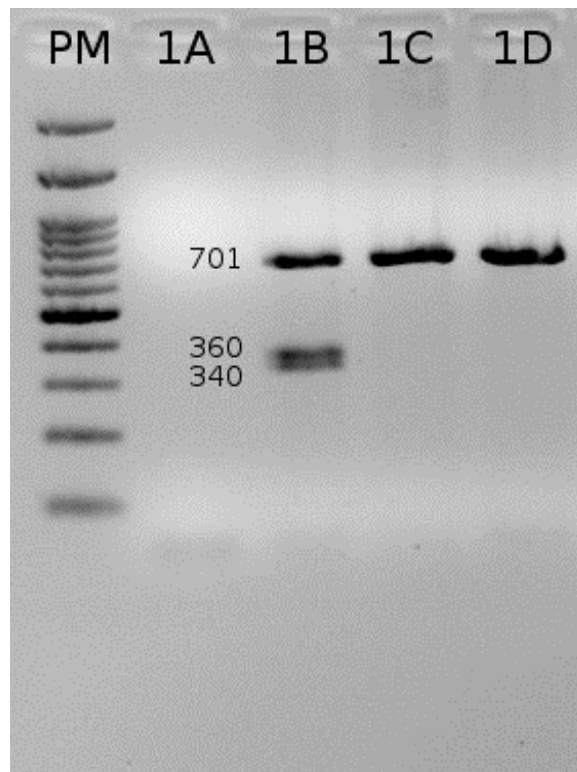


FIGURA 13 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO  $\phi\beta$

FONTE: A autora

#### NOTAS

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco

1B - Controle heterozigoto (NC/C)

1C - Controle heterozigoto negativo (NC/NC)

1D - Amostra homozigota negativa (NC/NC)

Interpretação: Região  $\phi\beta$  Hinc II -  $701=360+340+1$ .

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

1B- A banda mais alta correspondendo a 701 pb corresponde ao total da região amplificada do DNA.

360 e 340 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 701 pb. A banda de 1 pb não é visível por esta técnica.

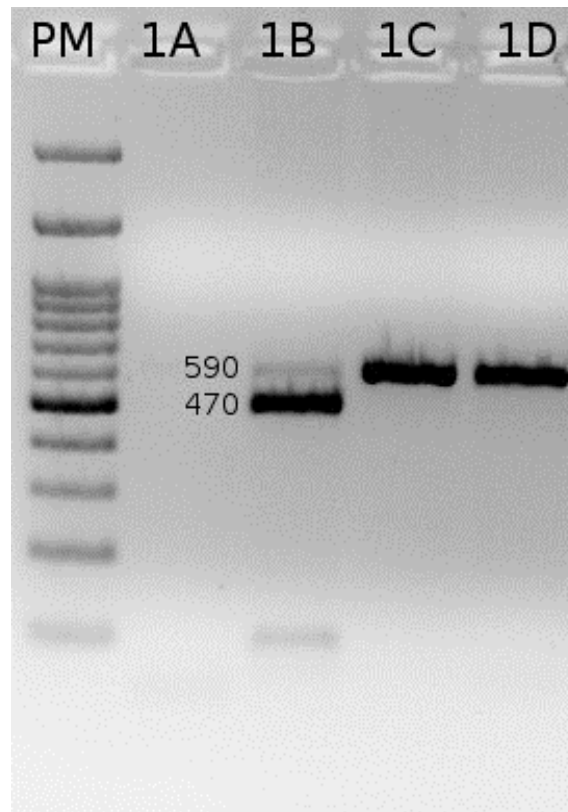


FIGURA 14 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO 3'  $\phi\beta$

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco;

1B - Controle homozigoto positivo (C/C)

1C - Controle homozigoto negativo (NC/NC)

1D - Amostra homozigota negativa.

Interpretação: Região 3'  $\phi\beta$  Hinc II 590=470+120.

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

A banda mais alta correspondendo a 590 pb, é o total da região amplificada do DNA.

470 e 120 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 590 pb. A banda de 120 pb é pouco visível por esta técnica.

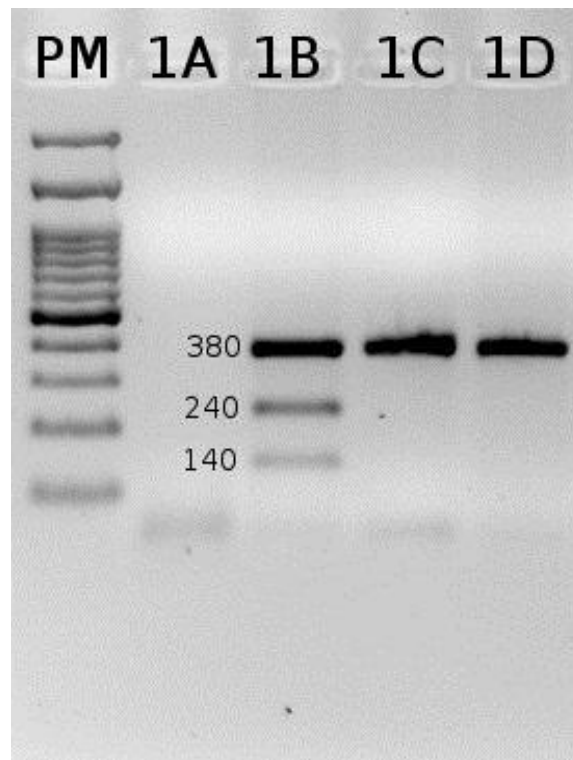


FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO 5'β

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco

1B - Controle heterozigoto NC/C (-/+)

1C - Controle homozigoto negativo (NC/NC)

1D - Amostra homozigoto negativo (NC/NC)

Interpretação: Região 5'β Hinf I -  $380=240+140$ .

Cada banda do marcador de Peso Moléculas corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

No pocinho 1B, a banda mais alta (380 pb) corresponde ao total da região amplificada do DNA.

Os fragmentos de 240 e 140 pb correspondem à clivagem da banda de 380 pb.

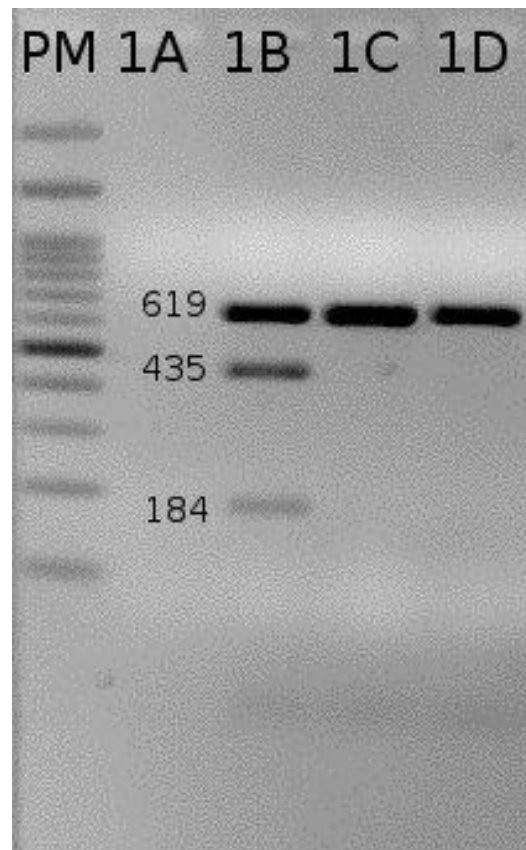


FIGURA 16 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO  $\epsilon$

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle branco

1B - Controle heterozigoto NC/C (-/+)

1C - Controle homozigoto negativo NC/NC.

1D - Amostra homozigota negativa NC/NC.

Interpretação: Região  $\epsilon$  HincII  $619=435+184$ .

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

A banda mais alta correspondendo a 619 pb (NC) é o total da região amplificada do DNA. Os fragmentos de 435 e 184 pb, correspondem à clivagem da banda de 619 pb.

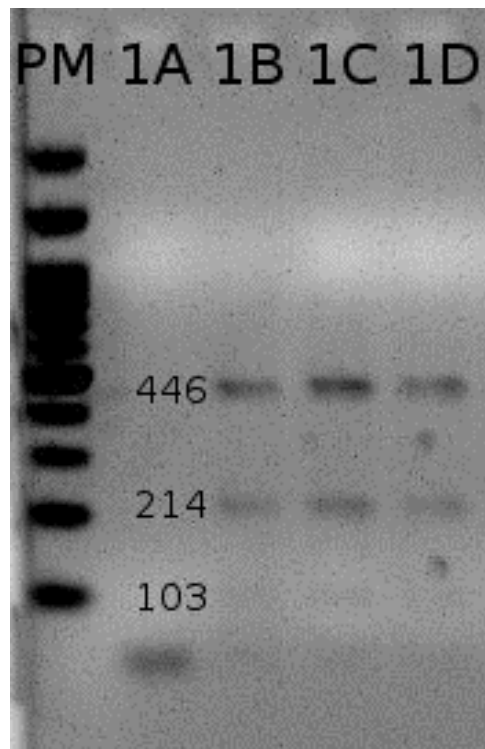


FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETIDIO - REGIÃO  $\beta$

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle Branco

1B - Controle homozigoto positivo ( C/C)

1C, 1D – Amostras homozigotas positivas (C/C)

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Interpretação: região  $\beta$  Ava II  $763=446+214+103$

Na posição 1A foi colocado o mix, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

As bandas 446 pb e, 214 pb, correspondem aos 2 fragmentos obtidos pela clivagem da banda de 763 pb (C).

O fragmento de 103 pb é pouco visível por esta técnica.

Não foi encontrado o fragmento total nesta amostra.

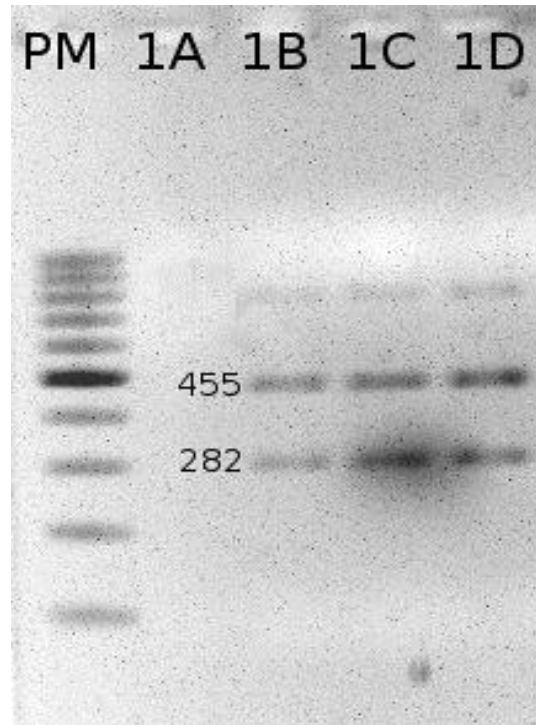


FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDIO - REGIÃO: 3'  $\beta$

FONTE: A autora

NOTAS:

PM - Marcador de peso molecular

1A - Controle Branco

1B - Controle homozigoto positivo (C/C)

1C - Amostra homozigota positiva (C/C)

1D- Amostra homozigota positiva (C/C)

Interpretação Região: 3'  $\beta$  BamHI 737=455+282

Cada banda do marcador de Peso Molecular corresponde a 100 pb. A banda mais intensamente corada corresponde a 500 pb.

Na posição 1A foi colocado o *mix*, sem o DNA, não se esperando nenhuma banda.

Os fragmentos de 455 pb e 282 pb, correspondem à clivagem da banda de 737 pb, que não foi encontrada nesta amostra.

Com os resultados obtidos a partir de cada enzima de restrição e utilizando o minipainel modificado de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989) (Quadro 2) foi possível identificar os cinco haplótipos da HbS até então conhecidos e nomeados: BENIN, CAR (BANTU), SENEGAL, CAMARÕES e ÁRABE-INDIANO.

Quando os resultados não foram concordantes para um dos haplótipos conhecidos, estes foram classificados como "atípicos". Para resultados em que os 2 haplótipos apresentaram padrões de cortes diferentes entre si e inconclusivos quanto ao genótipo, analisaram-se os resultados de genotipagem dos pais biológicos. Quando estes dados familiares foram insuficientes ou indisponíveis por motivos como adoção, um dos genitores falecido ou paternidade duvidosa, ao invés de se considerar dois haplótipos atípicos, foi considerado o haplótipo mais frequente nesta população que se aproximasse mais do perfil obtido pelas enzimas utilizadas, associado a um "atípico" (KUZOLIK *et al.*, 1986; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; INATI *et al.*, 2003).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO SEXO E IDADE

Dos 194 pacientes, 84 (43,3%) são do sexo masculino e 110 (56,7%) são do sexo feminino.

A idade variou de zero a 81,3 anos. A mediana da idade foi de 122,5 meses (mínimo: 0; máximo: 976).

A distribuição dos pacientes com doença falciforme por idade é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME A IDADE

GENÓTIPO / IDADE (anos)	0-11		12-18		19-81		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SS	52	52	26	26	22	22	100	100
Sβ	25	56	13	29	7	15	45	100
SC	40	82	5	10	4	8	49	100
TOTAL	117		44		33		194	100

FONTE: A autora

### 4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS CONFORME O SEXO

A distribuição dos genótipos por sexo está apresentada na tabela 2, não tendo havido diferença significativa ( $p=0,36$ ).



TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS POR SEXO

GENÓTIPO	SEXO	
	Masculino	Feminino
CAR/CI	11	13
CAR/CII	0	4
CAR/CIII	1	0
CAR/Catp	1	2
CAR/ $\beta$ I	3	8
CAR/ $\beta$ II	4	6
CAR/ $\beta$ VI	1	1
CAR/ $\beta$ IX	1	2
CAR/ $\beta$ atp	7	5
CAR/CAR	31	31
CAR/BEN	7	13
CAR/Satp	1	5
CAR/SEN	0	1
BEN/CI	6	9
BEN/CII	1	0
BEN/ $\beta$ I	0	1
BEN/ $\beta$ atp	0	2
BEN/ $\beta$ II	1	0
BEN/Satp	3	0
BEN/BEN	3	3
Satp/CI	1	0
Satp/ $\beta$ I	0	2
BEN/ $\beta$ IX	1	0
CAR/CAM	0	1
Satp/Satp	0	1
TOTAL = 194	84	110

FONTE: A autora

NOTA: CAR: República Centro Africana; BEN: Benin; SEN: Senegal;

CAM: Camarões; Satp: haplótipos atípicos da HbS.

CI, CII, CIII, Catp: haplótipos da Hb C.

$\beta$ I;  $\beta$ II;  $\beta$ VI;  $\beta$ IX;  $\beta$ atp: haplótipos da talassemia  $\beta$ .

Houve dificuldade na definição dos genótipos de 13 pacientes: em duas amostras, não foi possível a análise do sangue dos pais - uma das crianças é adotada e, da outra, o pai biológico é falecido. Nestes casos, o haplótipo foi definido somente pela genotipagem e resultados laboratoriais disponíveis. Nos outros 11 casos, foram analisados os resultados da eletroforese da hemoglobina dos pais, além da genotipagem.

### 4.3 FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NAS DF: SS, S-TALASSEMIA $\beta$ E DOENÇA SC

Foram identificados 25 genótipos na população de 194 pacientes genotipados cujas distribuições por frequências são mostradas nas tabelas 3, 4 e 5 para os pacientes diagnosticados como SS, S-talassemia  $\beta$  ou SC, respectivamente.

Entre os pacientes SS, a associação de haplótipos mais frequente foi CAR/CAR, seguida por CAR/BEN. Apenas um paciente apresentou um haplótipo SENEGAL e outro paciente um haplótipo CAMARÕES.

TABELA 3 FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES SS

GENÓTIPO	N	%
CAR/CAR	62	62
CAR/BEN	20	20
CAR/Satp	6	6
CAR/SEN	1	1
CAR/CAM	1	1
BEN/BEN	6	6
BEN/Satp	3	3
Satp/Satp	1	1
TOTAL	100	100

FONTE: A autora

NOTA: CAR: República Centro Africana; BEN: Benin; SEN: Senegal; CAM: Camarões; Satp: haplótipo atípico da HbS.

Para os pacientes com diagnóstico de S-talassemia  $\beta$ , houve predomínio da associação CAR/ $\beta$ I, seguida de CAR/ $\beta$ II.

TABELA 4 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES S-TALASSEMIA  $\beta$

GENÓTIPO	N	%
CAR/ $\beta$ I	11	24,4
CAR/ $\beta$ II	10	22,2
CAR/ $\beta$ VI	2	4,4
CAR/ $\beta$ IX	3	6,6
CAR/ $\beta$ atp	12	26,6
BEN/ $\beta$ I	1	2,2
BEN/ $\beta$ II	1	2,2
BEN/ $\beta$ atp	2	4,4
BEN/ $\beta$ IX	1	2,2
Satp/ $\beta$ I	2	4,4
TOTAL	45	100

FONTE: A autora

NOTA: CAR: República Centro Africana; BEN: Benin; Satp: haplótipo atípico da HbS.  
 $\beta$ I;  $\beta$ II;  $\beta$ VI;  $\beta$ IX;  $\beta$ atp: haplótipos da talassemia  $\beta$ .

Os pacientes com diagnóstico de DF SC apresentaram a associação de haplótipos CAR/CI como a mais frequente, seguida de BEN/CI.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS NOS PACIENTES SC

GENÓTIPO	N	%
CAR/CI	24	48,9
CAR/CII	4	8,1
CAR/CIII	1	2,01
CAR/Catp	3	6,1
BEN/CI	15	30,6
BEN/CII/	1	2,0
Satp/CI	1	2,0
TOTAL	49	100

FONTE: A autora

NOTA: CAR: Republica Centro Africana; BEN: Benin; Satp: haplótipo atípico da hemoglobina S.  
CI, CII, CIII, Catp: haplótipos da HbC.

#### 4.4 FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ

Considerando-se as diferentes hemoglobinopatias, o haplótipo predominante da HbS foi o CAR, que ocorreu em 76,0% dos pacientes SS, em 42,2% dos pacientes S-talassemia  $\beta$  e em 32,6% dos pacientes com doença SC. O haplótipo BEN foi encontrado em 17,5% dos pacientes SS, 5,5% dos pacientes S-talassemia  $\beta$  e em 16,3% dos pacientes com doença SC.

TABELA 6 - FREQUÊNCIA RELATIVA DOS GENÓTIPOS

GENÓTIPO	N	%
CAR/CI	24	12,4
CAR/CII	4	2,1
CAR/CIII	1	0,5
CAR/Catp	3	1,5
CAR/ $\beta$ I	11	5,7
CAR/ $\beta$ II	10	5,2
CAR/ $\beta$ VI	2	1,0
CAR/ $\beta$ IX	3	1,5
CAR/ $\beta$ atp	12	6,2
CAR/CAR	62	32,0
CAR/BEN	20	10,3
CAR/Satp	6	3,1
CAR/SEN	1	0,5
BEN/CI	15	7,7
BEN/CII	1	0,5
BEN/ $\beta$ I	1	0,5
BEN/ $\beta$ atp	2	1,0
BEN/ $\beta$ II	1	0,5
BEN/S atp	3	1,5
BEN/BEN	6	3,1
Satp/CI	1	0,5
Satp/ $\beta$ I	2	1,0
BEN/ $\beta$ IX	1	0,5
CAR/CAM	1	0,5
Satp/Satp	1	0,5
TOTAL	194	100,0

FONTE: A autora

NOTA: CAR: República Centro Africana; BEN: Benin; SEN: Senegal;

CAM: Camarões; Satp: HbS atípico.

$\beta$ I;  $\beta$ II;  $\beta$ VI;  $\beta$ IX;  $\beta$ atp = haplótipos da  $\beta$  talassemia.

CI, C II, CIII, Catp = haplótipos da Hb C.

#### 4.5 FREQUÊNCIA RELATIVA DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ

Quando se considera o haplótipo isoladamente, observa-se que houve predomínio do CAR em 57,2% de 388 alelos analisados, seguido do BEN em 14,4% (Tabela 7).

TABELA 7 -FREQUÊNCIA RELATIVA DOS HAPLÓTIPOS

HAPLÓTIPO	N	%
CAR	222	57,2
BEN	56	14,4
SEN	1	0,26
CAM	1	0,26
Satp	14	3,6
$\beta$ I	14	3,6
$\beta$ II	11	2,8
$\beta$ VI	2	0,5
$\beta$ IX	4	1,1
$\beta$ atp	14	3,6
CI	40	10,3
CII	5	1,29
CIII	1	0,26
C atp	3	0,77
TOTAL	388	100

FONTE: A autora

NOTA: CAR: República Centro Africana; BEN: Benin; SEN: Senegal;  
CAM: Camarões; Satp: HbS atípico.  
 $\beta$ I;  $\beta$ II;  $\beta$ VI;  $\beta$ IX;  $\beta$ atp= haplótipos da talassemia  $\beta$ .  
CI, C II, CIII, Catp=haplótipos Hb C.

#### 4.6 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ

Na figura 19, está ilustrada a distribuição dos genótipos quanto aos haplótipos, da anemia falciforme, no Estado do Paraná, por cidade e Regional de Saúde. Observa-se relativamente, maior número absoluto de casos de anemia falciforme na capital.

Na figura 20, está ilustrada a distribuição dos genótipos quanto aos haplótipos, da interação S-talassemia  $\beta$ , no Estado do Paraná, por cidade e Regional de Saúde. Observa-se relativamente, maior número absoluto de casos de S-talassemia  $\beta$  na região norte do estado, em comparação às demais regiões.

Na figura 21, está ilustrada a distribuição dos genótipos quanto aos haplótipos da doença SC, no Estado do Paraná, por cidade e Regional de Saúde.

Observa-se relativamente, maior número de casos de doença SC na região norte do estado, em comparação às demais regiões.

### GENÓTIPOS da ANEMIA FALCIFORME no ESTADO DO PARANÁ

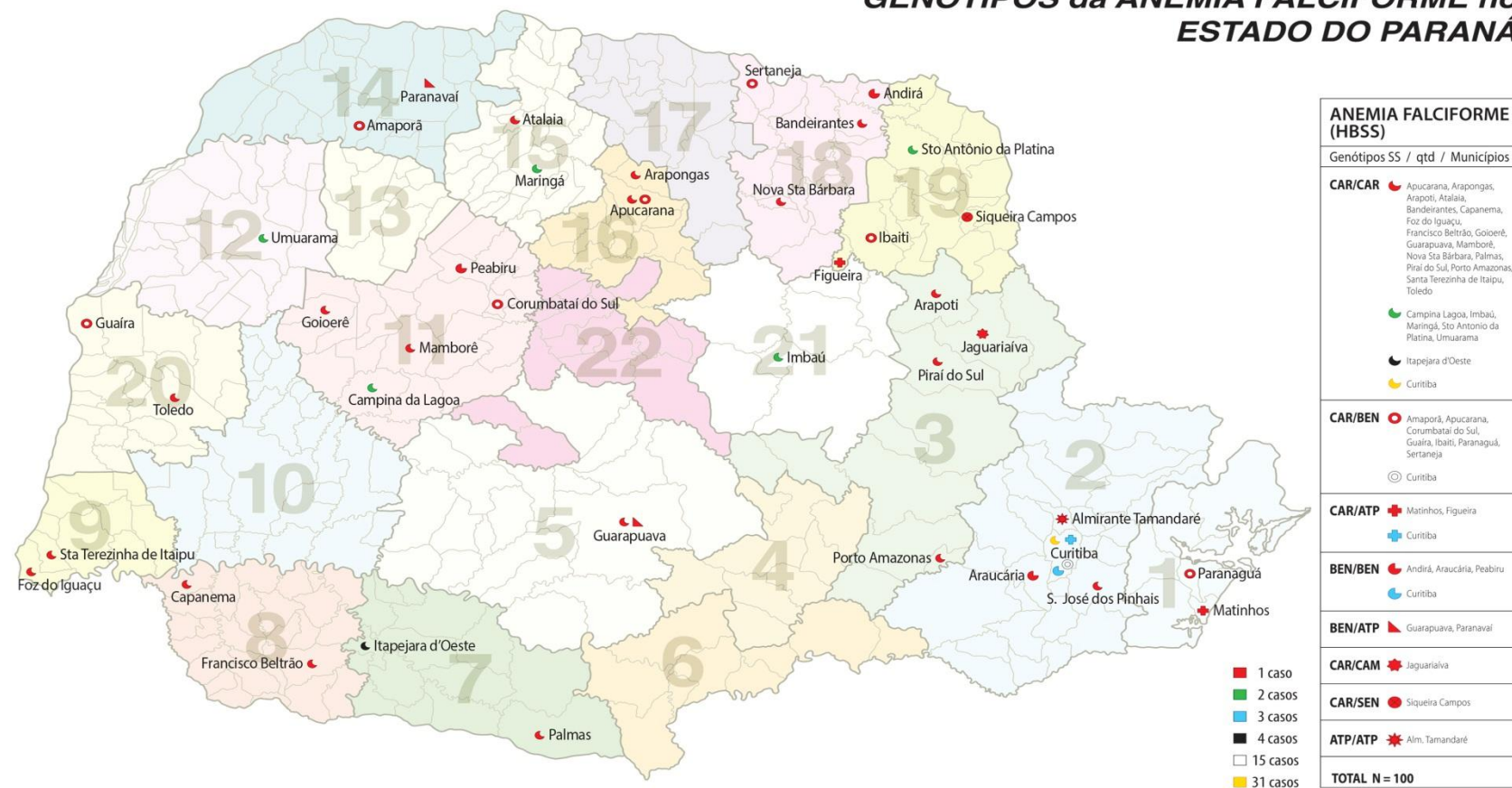


FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA HbS NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE.  
FONTE: A autora (2015)

## GENÓTIPOS da S $\beta$ TALASSEMIA no ESTADO DO PARANÁ

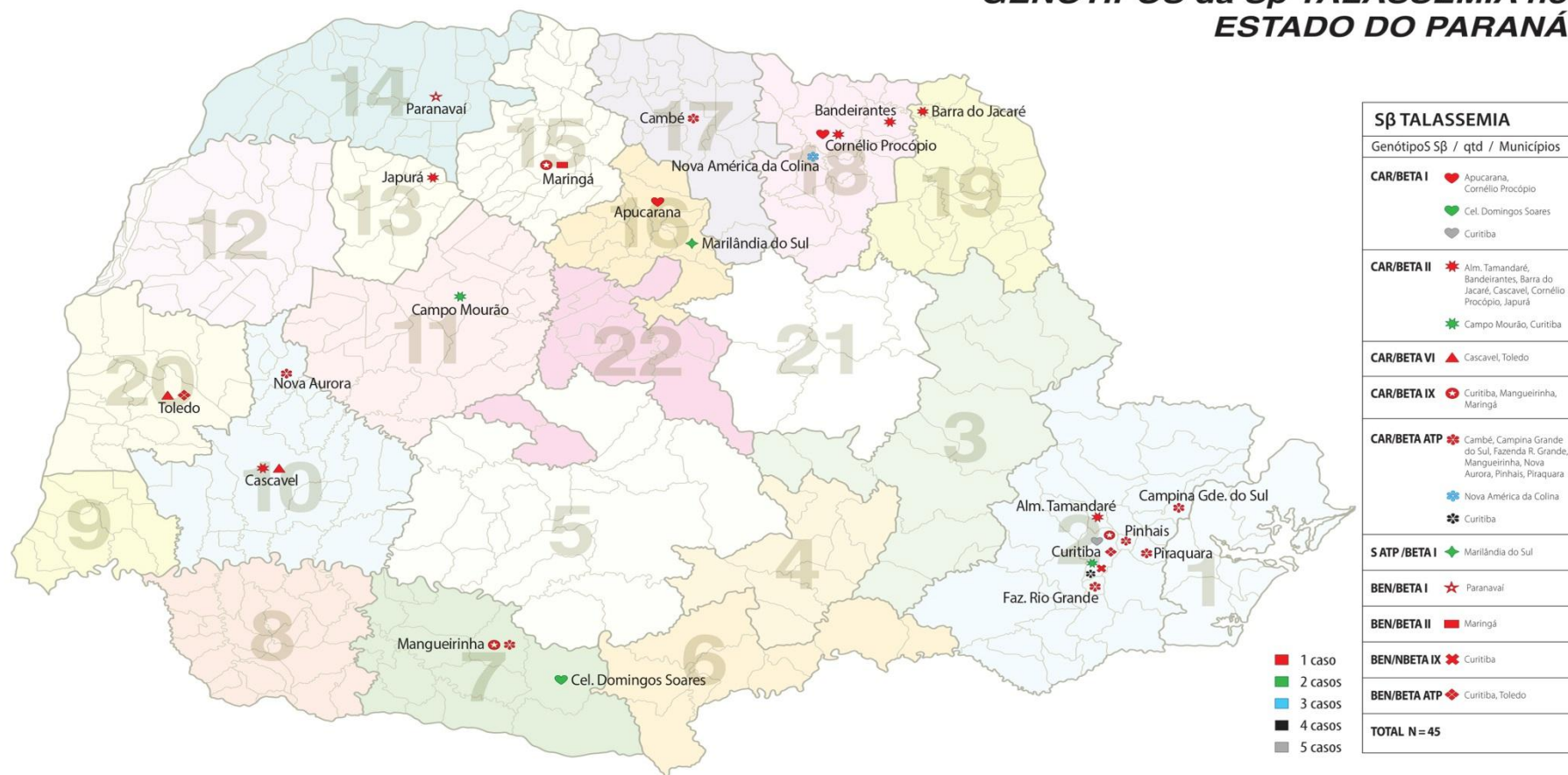


FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA DOENÇA S-TALASSEMIA  $\beta$  NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE.

FONTE: A autora(2015)



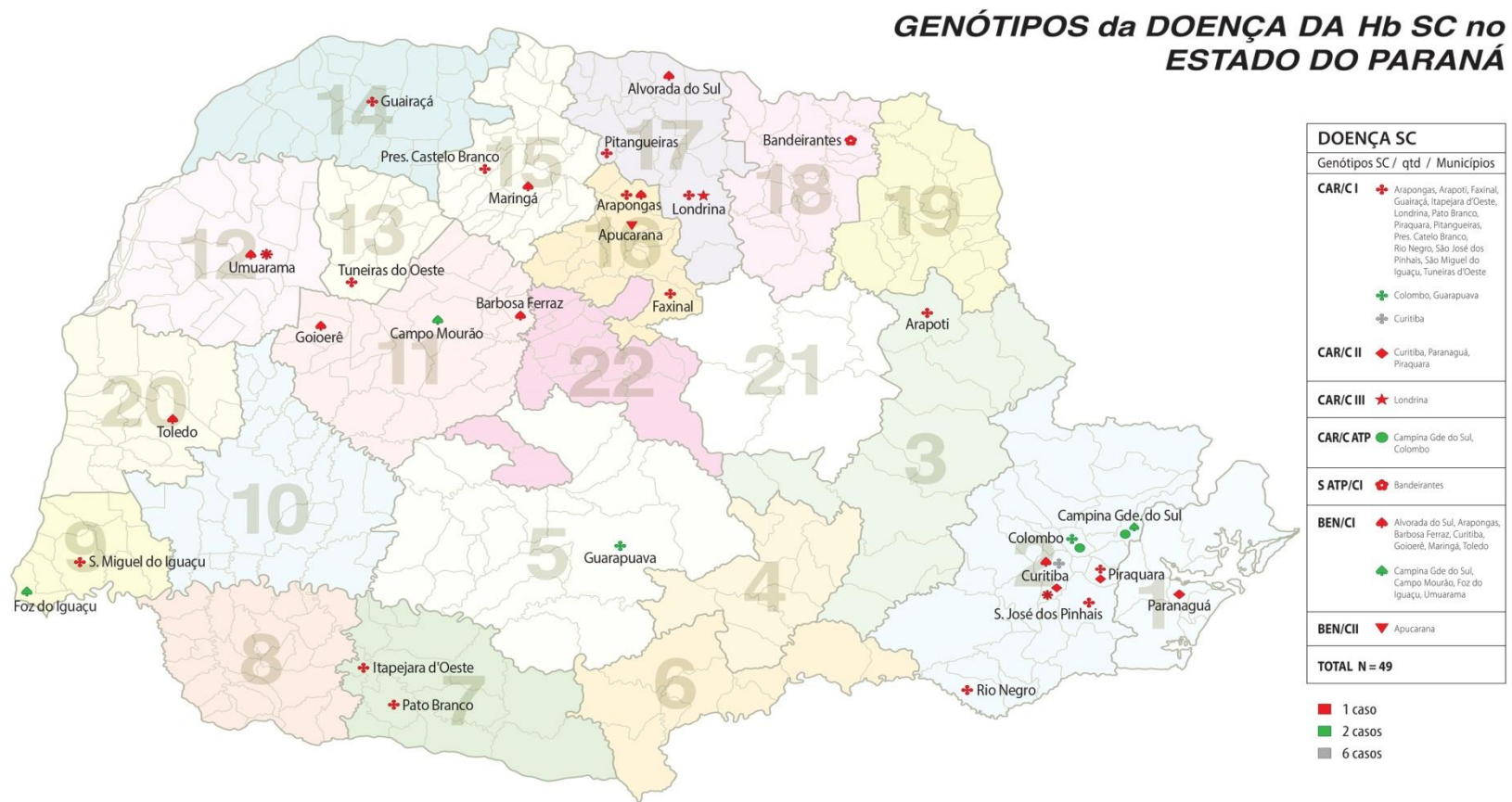


FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA DOENÇA DA HbSC NO PARANÁ POR CIDADE E REGIONAL DE SAÚDE. FONTE: A autora (2015)

## **4.7 HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES E EVOLUÇÃO CLÍNICA**

Para se avaliar a influência dos haplótipos na evolução clínica dos pacientes com doenças falciformes, foram analisados os prontuários de 122 pacientes atendidos no Serviço de Hematopediatria do HC-UFPR. Os dados clínicos foram coletados de acordo com a folha de evolução padronizada e preenchida a cada consulta (Anexo 4). Os registros foram separados pelo tipo de doença falciforme assim distribuídos: 52 pacientes com anemia falciforme (SS), 28 pacientes com S-talassemia  $\beta$  e 42 pacientes com doença SC. Para a análise da distribuição dos eventos clínicos, os pacientes foram estratificados em 2 grupos de acordo a idade: de 0-3 anos e de crianças com mais de 3 anos de idade até adolescentes com idade até 15 anos e 11 meses. Foram coletadas informações sobre a ocorrência de acidente vascular encefálico, frequência de alterações cardíacas, crises de dor, dactilite, infecção urinária, pneumopatia e sequestro esplênico. Os dados são apresentados na Tabela 8.

### **4.7.1 Distribuição dos Eventos Clínicos, de Acordo com a Idade e o Tipo de Doença Falciforme.**

A Tabela 8 apresenta o número de crianças que apresentaram determinado evento clínico, referente à faixa etária em que a criança se encontrava por ocasião do evento; foi obtido a partir da análise dos prontuários, cujas consultas seguem padrão de preenchimento tutorial (Anexo 4), tendo-se selecionado a idade de três anos como ponto de corte. No numerador, foi analisado a presença do evento e no denominador o nº de crianças analisadas, na faixa etária estabelecida.

Houve diferença estatisticamente significativa para a faixa etária até os 3 anos de idade, em relação à apresentação de dactilite ( $p < 0,001$ ) e de ocorrência de sequestro esplênico ( $p < 0,001$ ), ambos mais frequentes nos pacientes com genótipo SS. Alterações cardíacas, avaliadas com uso rotineiro de ecocardiograma, foram detectadas principalmente acima de 3 anos de idade, sendo encontradas em maior frequência nos pacientes com genótipos SS e SC. Observa-se ainda que houve tendência ( $p = 0,259$ ) ao aparecimento mais frequente de infecção urinária em crianças com genótipos SS e S-talassemia  $\beta$ , no grupo etário até 3 anos e acima dessa idade. Observou-se diferença significativa ( $p = 0,026$ ) na proporção de pacientes com infecção urinária para os pacientes com genótipos SC, quando comparados com os genótipos SS e S-talassemia  $\beta$ . Não houve diferença na frequência de crises de dor quanto à idade e ao tipo de doença. Apenas pacientes com genótipo SS apresentaram acidente vascular encefálico.

TABELA 8 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DE ACORDO COM O TIPO DE DOENÇA FALCIFORME, ENCONTRADAS EM CRIANÇAS ATÉ 3 ANOS DE IDADE E COM MAIS DE 3 ANOS, EM RELAÇÃO AO TOTAL DE CRIANÇAS NAS RESPECTIVAS FAIXAS ETÁRIAS

Manifestações Clínicas	Crianças de 0-3 anos		Crianças com mais de 3 anos de idade e adolescentes		<i>P</i>
	n	%	n	%	
Acidente vascular cerebral <sup>(1)</sup>					
Hb SS <sup>(2)</sup>	1/47	2,1	4/46	8,7	0,160
Hb SC	0/38		0/35		-
Sβ	0/23		0/26		-
Alterações cardíacas					
Hb SS <sup>(2)</sup>	3/47	6,4	13/46	28,2	0,005*
Hb SC <sup>(3)</sup>	0/38		7/35	20,0	0,037*
Sβ <sup>(2)</sup>	1/23	4,3	3/26	11,5	0,359
Crises de dor					
Hb SS <sup>(2)</sup>	41/47	87,2	34/46	73,9	0,104
Hb SC <sup>(2)</sup>	20/38	52,6	22/35	62,8	0,377
Sβ <sup>(2)</sup>	9/23	39,1	17/26	65,4	0,066
Dactilite					
Hb SS <sup>(2)</sup>	24/47	51,0	1/47	2,1	<0,001*
Hb SC <sup>(3)</sup>	3/38	7,9	0/35		0,238
Sβ <sup>(2)</sup>	3/23	13,0	1/26	3,8	0,241
Infecção urinária					
Hb SS <sup>(2)</sup>	7/47	14,9	2/46	4,3	0,085
Hb SC <sup>(2)</sup>	3/38	7,9	7/35	20,0	0,133
Sβ <sup>(2)</sup>	4/23	17,4	3/26	11,5	0,559
Pneumopatia					
Hb SS <sup>(2)</sup>	16/47	34,0	13/46	28,2	0,547
Hb SC <sup>(2)</sup>	13/38	34,2	11/35	31,4	0,800
Sβ <sup>(2)</sup>	8/23	34,7	7/26	26,9	0,551
Sequestro esplênico					
HbSS <sup>(2)</sup>	13/47	27,66	1/46	2,17	0,001*
HbSC <sup>(2)</sup>	1/38	2,63	3/35	2,86	0,265
HbSβ <sup>(2)</sup>	2/23	8,69	5/35	14,29	0,523

Fonte: a autora (2015)

Nota: os números de pacientes diminuem na 2ª coluna pois na 1ª coluna estão também incluídos os pacientes da 2ª coluna, que foram avaliados quando tinham menos de 3 anos de idade (estudo longitudinal).

(1) valores significativos  $P < 0,05$

(2) Teste binomial de 2 proporções

(3) Teste binomial de uma proporção

#### 4.7.2 Distribuição dos Eventos Clínicos de Acordo com os Genótipos Falciformes

Conforme evidenciado pelo teste de  $\chi^2$ , na Tabela 9, somente a variável dactilite apresentou diferença significativa quando sua ocorrência é comparada às diferentes associações de haplótipos, indicando que CAR/CAR apresentou mais casos de dactilite do que os demais genótipos estudados ( $p=0,01$ ).

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES COM SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

GENÓTIPO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS							
	Alteração cardíaca	AVC <sup>§</sup>	Dor	Síndrome Torácica Aguda	Dactilite		Infecção Urinária	Sequestro esplênico
					Sim	Não sabe		
CAR/CAR	11/32	4/32	29/31*	20/32	19/32	4/32	4/32	7/32
CAR/BEN	2/10	0/10	10/10	4/9*	3/10	2/10	3/10	4/10
CAR/SEN	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
CAR/Satp	1/4	1/4	3/3*	2/3*	1/4	2/4	1/3*	1/4
BEN/BEN	1/3	0/3	3/3	0/3	2/3	0/3	0/3	1/3
BEN/Satp	1/2	0/2	1/2	0/2	0/1	1/1	0/2	1/2
<i>p</i> parcial	0,901	0,047	0,275	0,113	0,223		0,606	0,812
CAR/ $\beta$ I	0/3	0/3	3/3	1/3	1/3	2/3	0/3	0/3
CAR/ $\beta$ II	2/6	0/6	5/6	3/6	2/6	0/6	2/6	3/6
CAR/ $\beta$ VI	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	1/2	0/1*	0/2
CAR/ $\beta$ IX	0/4	0/4	3/4	0/4	0/4	1/4	1/4	0/4
CAR/ $\beta$ atp	1/8	0/8	4/7*	4/8	0/8	2/8	1/8	1/8
BEN/ $\beta$ I	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	1/1
BEN/ $\beta$ atp	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
BEN/ $\beta$ II	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1
Satp/ $\beta$ I	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>p</i> parcial	0,369	0,00	0,326	0,339	0,158		0,157	0,068
CAR/CI	4/20	0/20	16/20	9/20	2/20	2/20	5/19*	3/20
CAR/CII	1/3	0/3	3/3	1/3	1/3	0/3	1/3	0/3
CAR/CIII	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1
CAR/Catp	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
BEN/CI	2/14	0/14	8/14	6/14	1/14	2/14	1/14	2/14
BEN/CII	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Satp/CI	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>p</i> parcial	0,936	0,00	0,692	0,535	0,987		0,287	0,969
<i>p</i> valor	0,686	0,501	0,301	0,341	0,010		0,113	0,341

FONTE: A autora (2015)

<sup>§</sup> *Doppler* transcraniano alterado

$\chi^2$ :  $p=0,01$

\* amostras excluídas

#### 4.8 ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NAS DOENÇAS FALCIFORMES E SUA RELAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS

Houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores médios de Hb, VCM, leucometria, contagem de plaquetas e reticulócitos, entre os diferentes genótipos de doença falciforme: SS, SC e S $\beta$  (Tabela 10). A leucometria média dos pacientes foi significativamente maior para o gênero masculino e pacientes com anemia falciforme. Os valores médios de HbF diferiram significativamente entre os gêneros ( $p=0,031$ ), os grupos etários ( $p=0,019$ ) e os genótipos ( $p<0,001$ ).

A Tabela 11 compara as variáveis hematológicas Hb, VCM, leucometria, contagem de plaquetas, porcentagem de reticulócitos e HbF, entre os diferentes haplótipos. Para tanto, o valor médio para cada haplótipo foi comparado com o valor médio do seu grupo (SS, SC ou S $\beta$ ). Observou-se que os haplótipos CAR/ $\beta$ II ( $p=0,018$ ) e CAR/ $\beta$ IX ( $p=0,041$ ) apresentaram valor médio de hemoglobina significativamente diferente do valor médio do seu grupo S $\beta$ . Os haplótipos CAR/CAR ( $p<0,001$ ), CAR/BEN ( $p<0,001$ ), CAR/Satp ( $p<0,001$ ), e BEN/BEN ( $p<0,001$ ), apresentaram valores de HbF significativamente diferentes do valor do seu grupo SS, sendo menores para associação CAR/CAR; o mesmo ocorreu para os dois pacientes com haplótipo CAR/ $\beta$ VI ( $p=0,05$ ).

Quanto aos valores de reticulócitos, identificam-se porcentagens visivelmente mais elevadas nos pacientes SS do que nos pacientes com DF S $\beta$  ou SC; valor menor é observado para a média referente aos 4 pacientes CAR/Satp, em relação à média do seu grupo. Pacientes com haplótipos CAR/ $\beta$ I e CAR/ $\beta$ II apresentaram valores médios maiores que a média do seu grupo, assim como o único paciente BEN/ $\beta$ I e o Satp/ $\beta$ I.

Em relação à contagem de plaquetas, somente o único paciente com haplótipo BEN/ $\beta$ I ( $p=0,007$ ) apresentou diferença significativa em relação ao valor médio do seu grupo S $\beta$ .

Observa-se, interessante, que os 4 pacientes com haplótipo CAR/Satp e o paciente com haplótipo CAR/SEN apresentaram valores médios mais baixos para leucometria, contagem de plaquetas e HbF.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, DE ACORDO COM GÊNERO, GRUPO ETÁRIO E TIPO DE DOENÇA FALCIFORME

	n	Hb (g/dL) <sup>(1)</sup>		VCM (fl) <sup>(1)</sup>		LEUCOMETRIA <sup>(1)</sup> (cél/s/mm³)		CONTAGEM DE PLAQUETAS (cél/s/mm³)		RETICULÓCITOS (%)		Hb FETAL(%)	
		Média±DP	<i>p</i>	Média±DP	<i>p</i>	Média±DP	<i>p</i>	Média±DP	<i>p</i>	Média±DP	<i>P</i>	Média±DP	<i>P</i>
Gênero													
Masculino	53	8,70 ± 1,76	<sup>(2)</sup> 0,149	76,60 ± 12,07	<sup>(3)</sup> 0,552	13.861 ± 4.964	<sup>(3)</sup> 0,043	423.138 ± 151.767	<sup>(3)</sup> 0,330	10,59 ± 8,17	<sup>(2)</sup> 0,944	8,53 ± 6,68	<sup>(3)</sup> 0,031
Feminino	69	9,09 ± 1,77		75,32 ± 11,41		12.162 ± 4.195		393.302 ± 177.733		9,82± 7,34		12,12 ± 8,86	
Grupo etário													
0 - 2	8	8,62 ± 1,69	<sup>(2)</sup> 0,831	67,48 ± 9,03	<sup>(3)</sup> 0,066	11.539 ± 2.727	<sup>(3)</sup> 0,112	344.875 ± 63.742	<sup>(3)</sup> 0,547	7,06 ± 7,19	<sup>(2)</sup> 0,450	11,47 ± 2,89	<sup>(3)</sup> 0,019
2-6	24	9,01 ± 1,64		74,38 ± 10,01		14.585 ± 3.890		418.257 ± 177.838		10,17 ± 7,21		15,76 ± 10,84	
>6	90	8,93 ± 1,82		77,02 ± 12,02		12.572 ± 4.825		408.522 ± 170.346		10,43 ± 7,87		9,54 ± 7,33	
Doença falciforme													
SS	52	7,33 ± 0,76	<sup>(2)</sup> <0,001	87,01 ± 6,96	<sup>(3)</sup> <0,001	15.298 ± 4.088	<sup>(3)</sup> <0,001	484.182 ± 147.551	<sup>(3)</sup> <0,001	17,30 ± 5,57	<sup>(2)</sup> <0,001	12,00 ± 7,25	<sup>(3)</sup> <0,001
SC	42	10,47 ± 0,99		70,25 ± 6,41		10.777 ± 3.784		315.365 ± 123.664		3,75 ± 1,83		4,94 ± 4,28	
Sβ	28	9,56 ± 1,55		63,65 ± 3,66		11.635 ± 4.683		397.904 ± 189.584		6,49 ± 5,01		15,05 ± 9,59	

FONTE: A autora (2015)

(1) Valor médio da média para cada paciente

(2) Análise pelo teste de Kruskal-Wallis

(3) Análise pelo teste One-Way ANOVA.

P < 0,05

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS DE HbS

	n	Hb (g/dL) <sup>(1)</sup>		VCM (fl) <sup>(1)</sup>		LEUCOMETRIA <sup>(1)</sup> (cél/mm <sup>3</sup> )		CONTAGEM DE PLAQUETAS (cél/mm <sup>3</sup> )		RETICULÓCITOS (%)		Hb FETAL (%)	
		Média±DP	p	Média±DP	p	Média±DP	p	Média±DP	P	Média±DP	P	Média±DP	p
SS -Haplótipos	52												
CAR/CAR	32	7,23 ± 0,86	0,579	86,89 ± 7,29	0,940	15.147 ± 4.516	0,875	490.989 ± 128.114	0,830	18,19 ± 5,35	0,472	9,60 ± 6,54	<0,001*
CAR/BENIN	10	7,39 ± 0,67	0,817	87,66 ± 6,94	0,788	16.015 ± 3.326	0,604	499.466 ± 186.935	0,775	16,90 ± 4,20	0,830	16,85 ± 6,28	<0,001*
CAR/SENEGAL	1	7,57	0,756	90,50	0,621	12.066	0,437	389.666	0,529	22,10	0,397	12,30	0,880
CAR/Satp	4	7,71 ± 0,70	0,337	85,03 ± 9,25	0,593	13.708 ± 5.080	0,463	386.542 ± 253.338	0,231	8,99 ± 5,97	0,006*	16,18 ± 9,89	<0,001*
BENIN/BENIN	3	7,60 ± 0,40	0,547	87,10 ± 2,52	0,982	16.702 ± 1.182	0,558	555.333 ± 101.177	0,416	17,07 ± 6,55	0,945	16,33 ± 5,63	<0,001*
BENIN/Satp	2	7,23	0,854	94,30	0,148	15.520	0,940	395.666	0,404	18,13	0,835	-	-
SC -Haplótipos	42												
CAR/CI	20	10,57 ± 1,08	0,719	71,55 ± 5,64	0,441	10.643 ± 4.256	0,901	315.033 ± 121.221	0,992	3,76 ± 1,62	0,983	5,61 ± 5,01	0,588
CAR/CII	3	11,14 ± 1,08	0,266	72,47 ± 3,19	0,558	10.499 ± 3.729	0,903	374.888 ± 218.134	0,446	4,35 ± 3,16	0,602	2,30 ± 0,85	0,297
CAR/CIII	1	10,47	1,000	74,60	0,506	8.103	0,489	197.666	0,352	4,00	0,893	-	-
CAR/Catp	2	10,35 ± 0,92	0,867	66,90 ± 12,59	0,489	8.958 ± 3.538	0,509	264.000 ± 140.950	0,570	3,78 ± 1,73	0,982	5,40 ± 5,94	0,884
BENIN/CI	14	10,17 ± 0,94	0,325	69,14 ± 7,24	0,589	11.048 ± 3.482	0,814	316.166 ± 124.077	0,983	3,78 ± 2,13	0,959	3,90 ± 3,61	0,418
BENIN/CII	1	10,46	0,992	64,60	0,389	16.180	0,166	301.000	0,909	2,00	0,350	9,50	0,298
Satp/ CI	1	10,83	0,721	61,40	0,180	11.373	0,877	367.000	0,682	2,71	0,577	7,30	0,589
Sβ -Haplótipos	28												
CAR/βI	3	8,98 ± 1,11	0,536	64,03 ± 2,31	0,862	17.506 ± 8.735	0,066	348.778 ± 70.079	0,663	10,76 ± 3,54	0,164	14,77 ± 5,56	0,961
CAR/βII	6	7,89 ± 1,10	0,018*	61,82 ± 2,07	0,248	12.650 ± 3.615	0,622	451.277 ± 225.168	0,548	10,24 ± 3,28	0,091	18,53 ± 9,65	0,426
CAR/βVI	2	10,25 ± 1,20	0,545	62,15 ± 2,76	0,577	6.658 ± 2.189	0,152	251.500 ± 58.218	0,293	2,03 ± 0,30	0,226	1,25 ± 1,48	0,055*
CAR/βIX	4	11,24 ± 0,14	0,041*	65,30 ± 4,42	0,416	7.617 ± 2.604	0,107	297.083 ± 41.922	0,304	2,19 ± 1,69	0,103	14,28 ± 8,86	0,881
CAR/βatp	8	10,15 ± 1,07	0,322	63,41 ± 5,23	0,883	12.091 ± 3.696	0,802	398.791 ± 90.815	0,990	3,94 ± 3,01	0,182	13,34 ± 10,39	0,665
BENIN/BI	1	7,20	0,146	62,10	0,681	9.970	0,729	966.000	0,007*	17,02	0,049*	14,30	0,939
BENIN/BII	1	8,07	0,353	68,30	0,223	14.310	0,579	772.666	0,062	3,43	0,553	-	-
BENIN/β atp	2	11,19 ± 0,83	0,157	66,10 ± 0,28	0,360	9.702 ± 2.887	0,573	328.777 ± 142.245	0,619	3,86 ± 2,61	0,473	18,40 ± 18,24	0,652
S atp/ βI	1	9,20	0,821	63,80	0,968	13.140	0,755	254.333	0,463	15,47	0,089	22,20	0,470

FONTE: A autora (2015)

Comparações entre média e DP de cada haplótipo com os valores de média e DP do seu respectivo grupo (SS, SC, Sβ da tabela 10), pelo teste “t” para amostras independentes utilizando dados resumidos. (1) valores significativos p-valor <0,05.

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES NO ESTADO DO PARANÁ**

A triagem neonatal no Estado do Paraná, realizada pelo Laboratório do Centro de Pesquisas da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (CEPE-FEPE), identificou que, no período de 2002 a 2008, considerando-se as DF, nasceram mais crianças com genótipo SS na região de Curitiba e norte do estado, enquanto que a S-talassemia  $\beta$  predominou nas regiões norte e sul do estado (WATANABE *et al.*, 2008). A distribuição da doença SC não foi avaliada naquele trabalho.

A análise dos pacientes, que provêm de todo o estado e que estão em acompanhamento ambulatorial no HC-UFPR ou no HEMEPAR, mostrou que a anemia falciforme se encontra distribuída por todo o estado, enquanto que a S-talassemia  $\beta$  e a doença SC concentram-se na região norte (Figuras 19, 20 e 21).

Não foram analisadas as razões demográficas ou históricas que levaram à diferenças na distribuição das doenças falciformes no estado do Paraná. Entretanto, a localização geográfica dos casos analisados, poderão auxiliar no planejamento de ações demográficas ou de saúde.

Entre os pacientes com anemia falciforme, bem como entre os com S- talassemia  $\beta$  e na doença SC, houve predominância do haplótipo CAR, seguido pelo BEN. Os haplótipos Senegal e Camarões, em igual frequência, foram identificados apenas nos pacientes com anemia falciforme.



## **5.2 ORIGEM ANTROPOLÓGICA DOS HAPLÓTIPOS DA HBS NAS DOENÇAS FALCIFORMES**

### **5.2.1 Na Anemia Falciforme**

Na América do Sul, onde predomina o haplótipo CAR, houve maior migração, nos séculos XVIII e XIX, ainda que forçada, de africanos provenientes de Angola, Congo e Moçambique, em oposição à América do Norte, cuja maior frequência é do haplótipo BEN, que recebeu o maior número de indivíduos do centro-oeste africano (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992).

Este é o primeiro trabalho no Brasil com o mapeamento molecular da DF no Estado do Paraná e mostra a predominância do haplótipo CAR (57,2%), seguido pelo BEN (14,4%) (Tabela 7), o que está de acordo com as informações obtidas nos registros históricos dos séculos XVIII e XIX, do Brasil escravagista (GUTIERREZ, 1988). Ainda no Paraná, considerando-se apenas a homozigose da HbS, o haplótipo CAR está presente em 76,0% dos casos, o BEN, em 17,5%; SEN e CAM em 0,5%; não sendo possível a classificação em 5,5% dos haplótipos como um dos nominados anteriormente, sendo então referidos como Satp ("S" atípico).

No Paraná, em pesquisa realizada nas "Listas Nominativas de Habitantes", no Arquivo de São Paulo, Gutierrez (1988; 2006), encontrou a naturalidade ou origem dos africanos em 1804, que forçosamente foram levados para as cidades de Antonina e Castro. Gutierrez afirma que, salvo imprecisões de registro, pode-se verificar que a maioria absoluta dos africanos que trabalhavam no Paraná descendia da comunidade dos bantos, que são provenientes da África Centro-Occidental e desde o século XVII foram majoritariamente trazidos para a região Sudeste (FARIAS, 2005). Nestas "Listas Nominativas", foram encontrados os seguintes números: em Antonina, 88% dos africanos eram bantos de diferentes regiões, sendo 27%, da Benguela, 55%, de Angola, 4%, do Congo e 2%, do Rebolo.

Doze por cento dos trabalhadores eram provenientes da região do Sudão, sendo 8%, de Mina e 4%, de Guiné, em 100 registros analisados. Do mesmo modo, nos registros da cidade de Castro foi encontrado que 95,2% eram bantos, sendo 63,3% de Benguela, 19,0% de Angola, 6,8% do Congo, 4,1% de Rebolo, 1,4% de Cassange e 0,7% de Cabinda. Da região do Sudão, vieram 4,8%, sendo 4,1% de Mina e 0,7% de Guiné, considerando-se 147 registros analisados.

Por outro lado, a pesquisa de Marcondes e Abreu (1991), cita que na região de Guarapuava, 30,9% dos nubentes eram africanos e destes, 20,6% eram originários da Guiné (MARCONDES; ABREU, 1991).

Machado (2008) encontrou que, na lista da freguesia de São José dos Pinhais, datada de 1803, de 92 escravos que estavam registrados com a cor de pele negra, identificavam-se quase todos como crioulos, isto é, negros já nascidos no Brasil e apenas 16 escravos foram identificados como africanos, sendo cinco "da Costa", quatro da Guiné, quatro de Angola, dois de Mina e um "do gentio". Em 1827, dos 285 escravos registrados em São José, 119 (42%) foram considerados pardos e 166 negros. Apenas oito desses últimos foram recenseados como africanos, sendo seis da Guiné e dois de Benguela. Nestes documentos fica evidenciada a migração interna dos africanos para o Paraná.

Probst *et al.* (2000) estudaram o polimorfismo do HLA na população de europeus, africanos e ameríndios que constituem a população do Paraná. No passado, a imigração dos africanos para o Brasil sempre esteve relacionada à escravidão.

Assim, a presença dos africanos no Sul do Brasil foi considerada pequena, pois o Paraná, nos séculos XVII e XVIII era um estado pobre, que vivia essencialmente da agricultura de subsistência no litoral e da pecuária, no planalto (GUTIERREZ, 1988). Entretanto, mesmo anteriormente à abolição, as migrações internas colaboraram para o aumento no número de afrodescendentes no Estado do Paraná (PROBST *et al.*, 2000).

Lima (2002 *apud* MACHADO, 2008), cita que existem listas nominativas de 1803, que mostram o deslocamento como migrantes internos, de pardos vindos para São José dos Pinhais, de São Francisco e ilha de Santa Catarina, de Antonina, Paranaguá, Curitiba, Lapa e Castro, além de outras regiões como São Paulo, Sorocaba, Mogi, Taubaté, Lorena Itu, ou de áreas mais longínquas, como Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Os registros históricos levantados por pesquisadores na área de História, dão respaldo aos resultados encontrados na genotipagem da HbS, no Paraná. A maior frequência do genótipo CAR em homozigose, encontrada entre os pacientes SS, é resultado do grande número de indivíduos africanos bantos da região atualmente conhecida como República Centro Africana (CAR) trazidos para o Estado do Paraná. Chegaram ao Brasil pelos Portos do Rio de Janeiro (GUTIERREZ, 1988) com entrada no Paraná pelo porto de Paranaguá, ao menos até 1855 (MACHADO, 2008). O Rio de Janeiro, como centro redistribuidor de africanos, teve papel fundamental na reprodução do escravagismo nas regiões sul-sudeste, pois através dos portos cariocas, distribuía por via marítima boa parte dos africanos para São Paulo e Paraná (então uma só capitania), Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além do Espírito Santo e Norte fluminense (FLORENTINO; RIBEIRO; da SILVA, 2004).

Por outro lado, o comércio escravagista para o Porto de Salvador, na Bahia, foi proveniente da Região da Costa da Mina, que compreende os países Gana, Togo, Benin ("pretos mina" e nagô) e Nigéria, onde o haplótipo BEN é predominante (CARVALHO, 1998; FLORENTINO, RIBEIRO; da SILVA, 2004; FARIAS, 2005). Este dado histórico está de acordo com a maior frequência de haplótipos BEN encontrada naquele estado. Também justifica a menor frequência deste haplótipo no Estado do Paraná, conforme os registros históricos, onde constam apenas 8% de africanos da região de Mina (GUTIERREZ, 1988) (Figura 22). Por outro lado, as migrações internas forçadas na época escravagista, as fugas e as mudanças espontâneas após este período, justificam a baixa frequência de haplótipos SEN e CAM, encontrada no Paraná.



FIGURA 22 - ORIGEM DA HbS NO ESTADO DO PARANÁ

FONTE:

<http://1.bp.blogspot.com/nPE1nTGMTL8/UWtdNCH7mml/AAAAAACKY/GFWMRsbzt4U/s640/Rotas+do+tr%C3%A1fico.jpg>.

acesso em 26.09.2015

### 5.2.2 Na Doença SC e S-talassemia $\beta$

O alelo  $\beta^C$  é encontrado em negros americanos e em africanos do norte de Gana, do território de Volta e em menor frequência, no oeste da Nigéria (BOEHM, 1985).

Em estudo retrospectivo realizado sobre os recém-nascidos na África, Piel *et al.* (2013) estimaram que, em 2010, nasceram 672.000 crianças que eram heterozigotos AC (8,9%) e 28.700 eram afetados com a condição homozigótica da HbC, sendo que 56% dos heterozigotos seriam de Burkina Faso, Gana e Nigéria, e 76% dos homozigotos seriam nascidos nos três países citados e também em Mali. Além da alta frequência esperada no oeste africano, pesquisas referindo a presença de HbC no Brasil, Estados Unidos e algumas capitais da Europa, refletem a dispersão deste gene nestes países.

Utilizando-se do modelo geoestatístico Bayesiano, os autores concluíram que além de Burkina Faso, o gene da HbC é prevalente no norte de Gana, Togo, Benin, Mali, leste da Mauritânia e sul da Argélia (PIEL *et al.*, 2013). No norte do Brasil, a HbC está predominantemente associada ao haplótipo falciforme BEN, conforme Menezes (2010) e Cajado *et al.* (2010), sugerindo que a HbC teve migração semelhante e concomitante ao haplótipo falciforme BEN, pois são de origens geográficas comuns. Na Bahia, a frequência do heterozigoto AC é de 3,5% (CAJADO *et al.*, 2010), enquanto que a prevalência no Estado do Paraná é de 0,6% (SRTN-PR-FEPE, 2014). No Paraná, pela maior associação do haplótipo CAR à HbC, e considerando também a baixa prevalência da HbC na população do estado, pode-se inferir que a miscigenação dos genes tenha ocorrido em terras brasileiras.

No artigo "Muito além do céu: escravidão e estratégias de liberdade no Paraná do século XIX", Hartung (2005) mostra que, próximo à época da Lei do Ventre Livre e Lei Áurea, as relações entre os escravos e os proprietários já tinham se modificado, havendo laços de amizade e sentimentos entre eles. Proprietários deixaram terras como herança para os escravos que faziam o papel de guardiães e protetores dos donos de terras. Houve também a inserção do escravo na sociedade local, com uniões matrimoniais dentro e fora de suas comunidades, demonstrando as primeiras miscigenações (HARTUNG, 2005). Com a lei do Ventre Livre, proposta por Pimenta da Veiga (MARCONDES; ABREU, 1991) e promulgada, em 1871, os filhos de escravos nascidos no Brasil passariam a ser livres, diminuindo-se a mão de obra africana, passando-se então a tentar atrair primeiramente os europeus e posteriormente os asiáticos, iniciando-se assim o processo de entrada de estrangeiros no país. No Paraná registros históricos mostram que a imigração de europeus iniciou-se, no século XIX com a vinda dos alemães, formando a colônia de Assunguy, em 1860, atual Cerro Azul (NISHIKAWA, 2007).

O processo de imigração dos europeus iniciou-se com o enfraquecimento da escravidão dos africanos no Brasil, que culminou com a Lei Áurea e acentuada diminuição de mão de obra. Apesar de haver registros da imigração italiana ao Brasil, em 1819, sua colonização no Sul do Brasil se iniciou, simbolicamente, em 1875, (TRENTO, 1989; PEREIRA, 2000) quando os primeiros contingentes entraram no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Em torno de 50 famílias italianas chegaram ao Brasil pelo Rio de Janeiro, com a promessa de irem a Santa Catarina, porém foram enviadas para uma cidade litorânea no Paraná, onde fundaram a cidade de Alexandra, próxima a Paranaguá (BALHANA, 1996). A estas, juntaram-se mais famílias de Mantua, Teramo e do Veneto, em 1876. Muitos abandonaram a cidade de Alexandra e foram a Morretes, onde em 1877 foi fundada a cidade de Nova Itália. Por volta de 1880, muitos italianos migraram para Curitiba, instalando-se os principais núcleos coloniais habitados por italianos. Alguns ainda se deslocaram-se para o meio rural com mão de obra assalariada e no trabalho das fazendas de café (PEREIRA, 2000).

Em análise dos grupos étnicos que imigraram para o Brasil nos séculos XIX e XX, identificou-se que havia a preocupação de vir numerário equilibrado de homens e mulheres dos países de origem, evitando-se a mistura inter-étnica, para manter as tradições de suas culturas. Por outro lado, a necessidade de integrar-se à comunidade local, com os nativos brasileiros, promoveu e ainda promove na atualidade as miscigenações entre os diversos grupos étnicos, além da mistura de costumes (PEREIRA, 2000).

No artigo "Política imigratória do Paraná", Balhana, em 1996, referiu que o interesse de imigrantes, sobretudo europeus, ocorreu pela necessidade de substituir a mão de obra escrava e ocupar "vazios demográficos". Assim, a colonização nos séculos XIX e XX abrangeu as regiões do Norte, Sudoeste e Oeste do Estado do Paraná, decorrente, sobretudo de migrações internas, pelas restrições nas políticas imigratórias nacionais e internacionais. Na década de 1870, na administração de Lamenha Lins, incentivou-se a colonização dos planaltos curitibanos e arredores. O grupo de imigrantes que se estabeleceu nestas áreas era bastante heterogêneo formado por alemães, italianos, poloneses (em maior número), franceses, suíços e ingleses, entre outros.

A associação da HbS, em processo de miscigenação com a talassemia  $\beta$ , parece ter ocorrido em maior frequência na região norte e na capital do Estado do Paraná, conforme a distribuição dos alelos (Figura 21), em concordância com a descrição histórica (BALHANA, 1996).

Entretanto, é preciso ressaltar que o número de pacientes com a associação S-talassemia  $\beta$  analisado foi pequeno e melhor conhecimento de sua distribuição geográfica depende da genotipagem de maior número de pacientes portadores desse gene no Estado do Paraná.

### 5.3 ASPECTOS MOLECULARES DOS HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES

O efeito protetor da hidroxiuréia ocorre em parte, devido ao aumento da produção de HbF que, além de inibir ou retardar a polimerização da Hb S, conduz à diminuição da falcização intravascular e aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (SILVA *et al.*, 2013).

Ainda que a presença do sitio polimórfico na região promotora do gene  $\gamma^G$ , propicie o aumento de HbF (INATI *et al.*, 2003), outros polimorfismos, dentro ou fora do grupamento da globina  $\beta$ , podem estar influenciando no desenvolvimento da doença (GABRIEL; PRZYBYLSKI, 2010). Assim, o haplótipo isoladamente pode não apresentar influência direta na sintomatologia clínica. Entretanto, existem os casos de haplótipos considerados mais graves, onde o uso da HU mostra respostas variáveis (GABRIEL; PRZYBYLSKI, 2010). A determinação dos haplótipos apresenta além do interesse epidemiológico, a possibilidade de se verificar seu efeito na modulação da expressão bioquímica da produção de HbF, para melhor caracterizar sua influência no tratamento ou no prognóstico do paciente.

Joly *et al.* (2011), genotiparam 8 sítios de restrição de pacientes SS:  $\epsilon$  (Hinc II), 5' $\gamma$  (Xmnl),  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  (HindIII),  $\phi\beta$  e 3' $\phi\beta$  (HincII),  $\beta$  (Avall) e 3' $\beta$  (BamHI), semelhante ao presente trabalho com exceção das regiões  $\epsilon$ ,  $\beta$  e 3' $\beta$ . Para a identificação dos haplótipos CAR e BEN, não foi necessário o reconhecimento dos sítios de restrição  $\epsilon$ ,  $\beta$  e 3' $\beta$ . Entretanto, para a melhor definição dos haplótipos CAMARÕES, SENEGAL e ÁRABE-INDIANO, Joly *et al.* (2011) utilizaram as enzimas de restrição Avall e BamHI (ou outra enzima que identifique o sítio 3' $\beta$ ) para confirmar a associação com a talassemia  $\beta$ , pois houve sobreposição de alelos  $\beta^C$  ou talassemia  $\beta^0$  com haplótipos falciformes característicos.

No presente estudo, dos 100 pacientes SS, 10 pacientes apresentaram haplótipos atípicos nos genótipos CAR/Satp(6), BEN/Satp(3) e Satp/Satp(1). Podem ser resultados de mutações de ponto por recombinação simples ou dupla entre dois haplótipos típicos da globina  $\beta^S$ , haplótipos da HbA e HbS, ou ainda, por conversão gênica (JOLY *et al.*, 2001; SUAREZ, 2011). Estes achados são concordantes com as características da população brasileira que é altamente miscigenada.

Belini *et al.* (2010), em São Paulo, descreveram uma paciente adulta com haplótipo CAR/Satp, sendo o haplótipo atípico molecularmente semelhante ao haplótipo SENEGAL encontrado no paciente do Estado do Paraná, identificado na presente pesquisa, diferenciando-se apenas na região 5'β (Hinf I negativo).

A presença do polimorfismo XmnI, na região 5'γ nas pacientes analisadas em São Paulo e no Paraná, sugere que a concentração de HbF seja maior que a dos pacientes CAR ou BEN. De fato, para ambas foram encontradas maior concentração de HbF sendo de 15,8% para a paciente de São Paulo e de 12,3% para a paciente do Paraná. Apesar de esta variável ser de bom prognóstico, a paciente do Paraná apresenta quadro clínico grave, provavelmente devido ao alelo CAR e por características da miscigenação.

Por outro lado, o sexo poderia influenciar nas manifestações clínicas, pois pacientes femininos teriam maior produção de HbF por fatores hormonais, ou pela presença de genes localizados no cromossomo X (MARCUS *et al.*, 1997). Não foi possível evidenciar este fato, pois no presente estudo, somente uma amostra apresentou o haplótipo SENEGAL. Assim, pela baixa frequência deste haplótipo no Brasil, demonstrada no Quadro 11, faz-se necessário desenvolver estudo multicêntrico nacional para melhor caracterização deste haplótipo da HbS na população brasileira.

Uma observação interessante, que mostra o detalhamento técnico, diz respeito ao que se encontrou na análise dos haplótipos do paciente identificado como RG=19, que apresentou o perfil genotípico descrito na Tabela 12.



TABELA 12 - PERFIL GENOTÍPICO DO PACIENTE n.º 19

RG	$\epsilon$ Hinc II	XmnI 5' $\gamma$	$\gamma^G$ Hind III	$\gamma^A$ Hind III	$\phi\beta$ HincII	3' $\phi\beta$ HincII	Hinfl 5' $\beta$	Avall $\beta$	BamHI 3' $\beta$	
19	- -	- +	+ +	- -	- +	- +	- +	+ +	+ +	CAR $\beta$ IX

FONTE: A autora (2015)

Considerando-se, apenas os sítios de restrição das regiões 5' $\gamma$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\phi\beta$ , 3' $\phi\beta$ , e 5' $\beta$ , no outro alelo que não o CAR, pode-se confundir com o haplótipo SENEGAL da globina  $\beta$  (LABIE *et al.*, 1985a). Porém com a análise da HbA<sub>2</sub>=5,4, HbF=13,5 e hemoglobina dos pais biológicos (mãe: AA; A<sub>2</sub>=5,7, HbF=1,6 e pai: AS), pode-se concluir que o paciente apresenta o haplótipo CAR/ $\beta$  IX. Assim pela técnica utilizada nesta tese, para a definição do resultado da genotipagem foi importante a análise de outros parâmetros laboratoriais além da análise dos pais biológicos quando disponíveis.

O haplótipo ÁRABE-INDIANO não foi encontrado nos pacientes que constituíram a amostra incluída neste trabalho.

### 5.3.1 Frequência dos Haplótipos da HbS no Brasil

Vários pesquisadores brasileiros se dedicaram a conhecer a distribuição dos haplótipos da HbS, em suas regiões geográficas. Em 22 pacientes SS atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, Galiza-Neto *et al.* (2005) encontraram as seguintes frequência dos haplótipos falciformes: 14 CAR (31,8%), 19 BEN (43,2%), 1 SENEGAL (2,3%) e 10 indeterminados ou atípicos (22,7%), totalizando 44 alelos analisados. Entretanto, em 34 pacientes atendidos no mesmo ambulatório citado por Galiza-Neto *et al.* (2005), a equipe de pesquisadores composta por Silva, Gonçalves e Rabenhorst (2009) (N=68 alelos) identificaram: 66,2% haplótipos CAR e 22% BEN. Esta diferença pode ser explicada pelo número de pacientes bem como de enzimas de restrição utilizadas: Galiza-Neto *et al.* (2005) utilizaram 13 enzimas e Silva, Gonçalves e Rabenhorst (2009) utilizaram 6 enzimas de restrição.

Adorno (2008), estudando 125 pacientes SS (N=250 alelos) atendidos no Hemocentro da Bahia (HEMOBA) em 2005, identificou 64 CAR/BEN (51,2%), 36 BEN/BEN (28,8%), 18 CAR/CAR (14,4%), 2 CAR/Satp (1,6%), 2 BEN/CAM (1,6%); e 1 CAR/CAM (0,8%).

Lyra *et al.* (2005) estudaram 71 pacientes SS (N=142 alelos), da cidade de Salvador, e de 70 cromossomos analisados, 48% eram do tipo CAR, 48% do tipo BEN e 3% Satp, enquanto que de 56 alelos analisados da cidade de São Paulo, 55% eram do tipo CAR, 34% do tipo BEN e 8,5% Satp. O genótipo que predominou nas duas cidades foi o CAR/BEN (40% em São Paulo e 54% em Salvador).

No Rio de Janeiro, Fleury (2007) estudou 74 pacientes (N=148 alelos), com anemia falciforme atendidos no HEMORIO, sendo identificados 66 haplótipos BEN (44,59%), 80 CAR (54,05%) e 2 SENEGAL (1,35%), nos seguintes genótipos: CAR/CAR=21,6%, CAR/BEN=63,6%, BEN/BEN=12,2%, CAR/SEN=1,3% e BEN/Sen=1,3%.

Silva, Klautau-Guimarães e Grisoloa (2010), no Recôncavo Baiano, Bahia, genotiparam um grupo 114 indivíduos sadios, sendo: 100 AA, 3 AC, 11 AS e em outro grupo genotiparam 168 indivíduos, constituído por 22 AS, 17 SS, 12 SC e 3 CC. Dos 17 pacientes SS, foram identificados 18 haplótipos BEN (52,9%), 11 haplótipos CAR (32,35%), 1 CAMARÕES (2,94%) e 4 Satp (11,76%), totalizando 34 cromossomos. Dos 12 pacientes SC, em relação à  $\beta^S$  globina foram identificados 6 haplótipos BEN, 4 CAR e 2 Satp.

Cabral (2010), em sua dissertação de mestrado, no Rio Grande do Norte, genotipou 53 pacientes homozigotos para HbS (N=106 alelos), e encontrou 80 haplótipos CAR (75,5%), 12 BEN (11,3%), 7 CAM (6,6%) e 7 Satp (6,6%). Considerando-se os genótipos, foram identificados CAR/CAR: 58,5%; CAR/BEN: 16,9%; CAR/CAM: 13,2%; BEN/BEN: 1,9%; CAR/Satp: 3,8%, BEN/Satp: 1,9% e Satp/Satp: 3,8%.

Em Mato Grosso do Sul, Salles (2011), também em dissertação de mestrado, analisou 47 pacientes com anemia falciforme (N=94 alelos) encontrando os seguinte genótipos: CAR/CAR: 22 (46,8%); CAR/BEN: 14 (29,8%); CAR/Satp: 7 (14,9%); BEN/BEN: 2 (4,3%); BEN/Satp: 1 (2,1%) e BEN/CAM: 1 (2,1%). Considerando-se os haplótipos, foram identificados: 65 CAR (69,14%), 20 BEN (21,27%), 8 Satp (8,51%) e 1 Camarões (1,06%).

No Quadro 11 estão relacionados os trabalhos realizados pelos pesquisadores acima mencionados, nas diversas regiões do país.

A identificação dos haplótipos da HbS no estado do Paraná, (76% de haplótipos CAR, 17,5% BEN, 0,5% de Senegal e Camarões e 5,5% de haplótipos atípicos, não sendo encontrados os haplótipos Árabe-Indianos), corrobora com os resultados encontrados por outros pesquisadores, que mostram que no Brasil, predomina o haplótipo CAR. A presença de haplótipos atípicos, no Paraná, são concordantes com os achados em outras regiões do país, que podem ser resultados de miscigenações entre os diferentes grupos étnicos que se estabeleceram no Brasil (Quadro 11).

Na Bahia, o predomínio do haplótipo BEN, é concordante com os eventos históricos, pois a entrada de africanos ao Brasil, provenientes da região do noroeste africano, da região do Benin, ocorreu predominantemente pelos portos de Salvador.

QUADRO 11 - HAPLÓTIPOS DA HbS NA ANEMIA FALCIFORME- BRASIL

ANO	LOCAL	AUTORES	SS (N) alelos	CAR %	BEN %	SENEGAL %	CAMARQUES %	ARABE- INDIANO	ATÍPICO %
1992	Ribeirão Preto SP	Zago, Figueiredo e Ogo	74	66,2	23,0	1,3	0	0	18,9
1998	HEMOPA-Belém	Pante-de-Souza <i>et al.</i>	60	67,0	30	3,3	0	0	0
2003	Salvador HEMOBA, HU UFBA	Gonçalves <i>et al.</i>	160	48,1	45,6	0,6	0	0	5,6
2005	Ceará	Galiza Neto <i>et al.</i>	44	31,8	43,2	2,3	0	0	22,7
2005	Salvador	Lyra <i>et al.</i>	70	48	48	0	0	0	3,0
	São Paulo		56	55	34	0	0	0	8,5
2007	Rio de Janeiro	Fleury	148	54,0	44,6	1,4	0	0	0
2008	Salvador HEMOBA	Adorno	250	41,6	55,2	0,4	1,2	0,4	1,2
2009	Ceará	Silva, Gonçalves e Rabenhorst	68	66,2	22	0	0	0	0
2009	Rio Grande do Sul	Lindenau	220	67,3	25,0	0,5	0,9	0	6,4
2010	Recôncavo Baiano -Ba	Silva, Klautau-Guimarães e Grisoloa	17	32,35	52,9	0	2,9	0	0
2010	Ceará	Cabral	106	75,5	11,3	0	6,6	0	6,6
2011	Mato Grosso Sul	Salles	94	69,1	21,2	0	1,0	0	8,5
2012	Rio de Janeiro	Silva-Filho <i>et al.</i>	168	70,8	22,6	0	0	0	6,5
2013	Rio de Janeiro	Okumura, Lobo, Bonini-Domingos	1054	72,9	20,3	0,29	0,57	0,28	5,7
<b>2015</b>	<b>Paraná</b>	<b>Presente estudo</b>	<b>200</b>	<b>76,0</b>	<b>17,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>5,5</b>

FONTE: A autora

NOTA: Os dados publicados foram normalizados onde N= n.<sup>o</sup> alelos e os genótipos expressos apenas em haplótipos.

### 5.3.2 Frequência dos Haplótipos da S-talassemia $\beta$ no Brasil

No presente estudo, foram genotipados 45 pacientes com associação S-talassemia  $\beta$ , atendidos na rede pública do Estado do Paraná, representando 90 alelos. Os haplótipos identificados, em relação ao gene da talassemia  $\beta$ , foram: 14  $\beta$ I, 11  $\beta$ II, 2  $\beta$  VI, 4  $\beta$  IX e 14  $\beta$  atp. Na população analisada, não foram encontrados, os haplótipos  $\beta$ III,  $\beta$ IV,  $\beta$ V,  $\beta$ VII e  $\beta$ VIII.

Na tabela 13, observa-se a distribuição dos haplótipos da associação S-talassemia  $\beta$ , encontrada no Estado do Paraná, em comparação com o estado de Pernambuco, avaliado por Bezerra (2007) onde se verifica semelhança na frequência relativa do haplótipo  $\beta$ I. No Paraná, houve predomínio dos haplótipos  $\beta$ I e  $\beta$ atp (31,1%) seguido do  $\beta$ II(24,4%),  $\beta$ IX(8,8%) e  $\beta$ VI(4,4%) e, em Pernambuco, predominaram os haplótipos  $\beta$ VI(27,1%),  $\beta$ atp(15,7%)  $\beta$ V(14,2%) e  $\beta$ II(11,4%). Assim como no Estado do Paraná, na amostra de Pernambuco também não foram encontrados os haplótipos talassêmicos  $\beta$ III,  $\beta$ IV,  $\beta$ VII e  $\beta$ VIII. Entretanto, o predomínio dos haplótipos  $\beta$ V( $p=0,032$ ) e  $\beta$ VI( $p=0,002$ ), naquele estado, é estatisticamente significativo.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS S-TALASSEMIA  $\beta$  DO PR E PE

HAPLÓTIPOS S-TALASSEMIA $\beta$	PARANÁ (2015)		PERNAMBUCO (2007)		$p^{(1)}$
	N.	%	N.	%	
I	14	31,1	22	31,4	0,971
II	11	24,4	8	11,4	0,067
III	0	0	0	0	-
IV	0	0	0	0	-
V	0	0	10	14,2	<sup>(1)</sup> 0,032
VI	2	4,4	19	27,1	<sup>(1)</sup> 0,002
VII	0	0	0	0	-
VIII	0	0	0	0	-
IX	4	8,8	0	0	0,053
Atípico	14	31,1	11	15,7	0,051
TOTAL	45		70		

FONTE: A autora

(1)  $p < 0,05$ .

No grupo pesquisado por Lee *et al.* (2002), analisando 9 alelos talassêmicos  $\beta$ , de pacientes não aparentados de Seul, Coréia, os haplótipos identificados foram 2  $\beta$ I; 3  $\beta$ IV, 3  $\beta$ VII e 1  $\beta$  atípico (LEE *et al.*, 2002).

À exceção do haplótipo  $\beta$ I, os haplótipos da talassemia  $\beta$  do Estado do Paraná e de Pernambuco diferem dos encontrados por Lee *et al.* que utilizaram as mesmas enzimas e sítios de restrição utilizados por Orkin *et al.* (1982).

Além da população analisada no Paraná e em Pernambuco no Brasil ser maior, as origens geográficas das amostras são diferentes; a predominância da talassemia  $\beta$  no Paraná é de origem mediterrânea, e a pesquisada por Lee *et al.* é coreana.

Tanto no sul quanto no norte do Brasil, observa-se predominância da mutação talassêmica  $\beta$ I. Além disso, na região norte do país em relação ao sul, houve predominância do tipo  $\beta$ VI que se associa com baixa concentração de HbF e baixa contagem de reticulócitos.

Entretanto, comparando-se a HbF dos pacientes com S-talassemia  $\beta$  da região sul com a do norte, verifica-se semelhança para o genótipo CAR/ $\beta$ I no PR, cuja média $\pm$ DP foi 14,77 $\pm$ 5,56% e em PE, média de 14,0%; e diferença para o genótipo CAR/ $\beta$ II no PR, de 18,53 $\pm$ 9,65 e em PE=10,7%.

Não foi identificado o genótipo CAR/ $\beta$ IX na publicação referente ao norte do país. Em relação ao genótipo CAR/ $\beta$ atp, no Paraná a média da HbF foi de 13,34% $\pm$ 10,39. Já em Pernambuco, a concentração de HbF variou de 14% a 25,4% dependendo dos diferentes polimorfismos  $\beta$  atp identificados.

Os pacientes CAR/ $\beta$ VI de Pernambuco apresentaram HbF=1,9%; Hb=11,7g/dL, semelhantes à média para os 2 pacientes do Paraná: HbF=1,25 $\pm$ 1,48% e Hb=10,25 $\pm$ 1,20g/dL. Estudos mais detalhados em relação ao fluxo gênico da talassemia  $\beta$  devem ser realizados para se conhecer a origem deste gene no Brasil além da identificação dos polimorfismos na cadeia de globina talassêmica  $\beta$ , dos pacientes do Estado do Paraná.

Pelas enzimas de restrição, não é possível diferenciar os haplótipos da talassemia  $\beta^+$  da talassemia  $\beta^0$  e os haplótipos da  $\beta^A$  normal. Para o diagnóstico de S $\beta^+$  utiliza-se entre outros parâmetros laboratoriais, a presença de HbA normal, em concentração menor do que a HbS.

Pela possibilidade de equívocos na identificação dos haplótipos da talassemia  $\beta$ , por situações onde o paciente possa ter sido transfundido sem haver relato ou registro, discrepâncias entre o diagnóstico laboratorial e molecular ou ainda discrepâncias com o genótipo dos pais biológicos, faz-se necessária a genotipagem populacional de indivíduos com hemoglobina normal do Paraná previamente identificados por eletroforese alcalina. Estes podem ser representados pelos doadores de sangue da rede pública ou por recém-nascidos triados pelo SRTN do Estado do Paraná. Para a definição do perfil genotípico do grupamento do gene  $\beta$  normal, pode-se iniciar esta triagem por heterozigotos sadios da HbS.

Bahadir *et al.* (2009) genotiparam 22 pacientes com talassemia *major* e 72 indivíduos com HbAA, moradores em uma província da Turquia.

Empregaram as mesmas enzimas de restrição do presente estudo, com exceção da XmnI, que não utilizaram, e a HinfI utilizada para a região 3' $\beta$ .

Através do programa informatizado Arlequin versão 3.1, compararam as variações de sequências entre os haplótipos da globina  $\beta$  normal com os da talassemia  $\beta$ , em um processo denominado *frameworks*. Os haplótipos talassêmicos  $\beta$  encontrados em relação à população normal daquela região foram: I, III, IV, V, VI, VII e IX (BAHADIR *et al.*, 2009).

Utilizando-se a análise dos genótipos do grupamento da globina  $\beta^A$ , conforme realizado por Bahadir *et al.* (2009), será possível conhecer o perfil genotípico da população paranaense e conseqüentemente a melhor definição dos haplótipos S-talassêmicos  $\beta$ .

A genotipagem da globina  $\beta^A$  de indivíduos sadios da população do Paraná deverá esclarecer os haplótipos atípicos da globina  $\beta$  talassêmica encontrados.

### 5.3.3 Frequência dos Haplótipos da Doença SC no Brasil

Nos 49 pacientes SC genotipados no presente estudo, no Paraná, foram identificados: 40 haplótipos CI (83,3%), 5 CII (8,3%), 1 CIII (2,1%) e 3 C atípicos (6,3%). Dos 49 pacientes SC, os haplótipos para HbS foram assim distribuídos: 24 CAR, 15 BEN, 1 Satp associados ao haplótipo CI. Em relação aos 4 pacientes com haplótipo CII, 4 são CAR e 1 BEN. Junto ao haplótipo CIII, foi genotipado 1 CAR e em relação ao Catp foram genotipados 3 CAR.

Quanto aos genótipos de pacientes SC, observou-se a seguinte distribuição: CAR/CI (48,9%), CAR/CII (8,1%), CAR/CIII (2,01%), CAR/Catp (6,1%), BEN/CI (30,6%), BEN/CII (2,0%) e Satp/CI (2,0%).

No grupo dos pacientes com HbC (10 SC, 4 CC) estudados por Silva (2007), no Recôncavo Baiano, os haplótipos da HbC, identificados foram: 8 CI (44,4%), 9 CII (50,0%) e 1 Catp (5,6%) provenientes de N=18 cromossomos.

Na dissertação de mestrado de Malva-Silva (2008), foram genotipados 60 pacientes SC atendidos na UNIFESP, em São Paulo, com idade variando de 1 a 17 anos. Houve predominância do haplótipo CAR(56,7%) seguido do BEN(41,7%) e SEN(1,6%). Em relação aos haplótipos da globina B<sup>C</sup>, houve predominância do haplótipo CI (90%), seguido por CII e CIII (5%). A distribuição por frequência dos genótipos foi: CAR/CI (55%), CAR/CIII (1,66%), BEN/CI (35%), BEN/CII (5%), BEN/CIII (1,66%) e SEN/CIII (1,66%). Os resultados são semelhantes aos encontrados no Paraná (Tabela 14).

TABELA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA DE HAPLÓTIPOS DA DOENÇA SC NOS ESTADOS DO PR E SP

SC	PARANA % (n=49)	UNIFESP % (n=60)	P
CAR/CI	48,9	55,0	0,531
CAR/CII	8,1	0,0	0,107
CAR/CIII	2,01	1,66	0,885
CAR/Catp	6,1	0,0	0,218
BEN/CI	30,6	35,0	0,628
BEN/CII	2,0	5,0	0,414
BEN/CIII	0,0	1,66	0,885
SEN/CI	0,0	1,66	0,885
Satp/CI	2,0	0,0	0,885

FONTE: A autora (2015)

NOTA:  $p < 0,05$ .

No quadro 12, estão inseridos os trabalhos realizados pelos pesquisadores brasileiros em relação aos haplótipos da HbC na doença SC.



QUADRO 12 - HAPLÓTIPOS DA HbC NA DOENÇA SC – BRASIL

ANO	LOCAL	AUTOR(ES)	N. PACIENTES	CAR/CI		CAR/CII		CAR/CIII		BEN/CI		BEN/CII		BEN/CIII		SEN/CIII		Satp/CI		CAR/Catp	
				N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
2007	Recôncavo Baiano	Silva <sup>(1)</sup>	10	3	30,0	2	20,0	0	0	3	30,0	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	Ba	Menezes	26	11	44,4	1	3,7	1	3,7	11	40,75	2	7,41	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	Ba	Cajado <i>et al.</i>	63	20	31,7	5	7,9	0	0	29	46,1	7	11,1	0	0	0	0	2	3,0	0	0
2008	SP	Malva-Silva	60	33	55,0	0	0	1	1,66	21	35,0	3	5,0	1	1,66	1	1,66	0	0	0	0
2015	PR	Presente estudo	49	24	48,9	4	8,1	1	2,1	15	31,3	1	2,1	0	0	0	0	1	2,1	3	6,1

FONTE: a autora (2014)

NOTA: <sup>(1)</sup> Frequência recalculada sobre 10 pacientes SC. Na tese original foram 10 pacientes SC e 4 CC sendo N=14.

#### 5.4 HAPLÓTIPOS DAS DOENÇAS FALCIFORMES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Existe dificuldade em se prever a gravidade clínica das doenças falciformes na infância, gerando incerteza nos familiares quanto aos cuidados necessários. Felizmente a mortalidade nas crianças vem diminuindo, pelo uso profilático de antibióticos contra bactérias invasivas. A prevenção contra o AVC é possível, pelo uso de ultrassonografia com *Doppler* transcraniano, que poderá orientar ou não transfusões de substituição de concentrado de hemácias (QUINN *et al.*, 2007).

No estudo das 122 crianças com doença falciforme em tratamento e seguimento no HC-UFPR, em Curitiba, na comparação dos valores hematimétricos entre os 3 grupos das doenças falciformes, a anemia falciforme apresentou  $Hb=7,33\pm0,76\text{g/dL}$ ; a doença SC,  $Hb=10,47\pm0,99\text{g/dL}$  e a S-talassemia  $\beta$ ,  $Hb=9,56\pm1,55\text{g/dL}$  ( $p<0,001$ ). A diferença entre as médias $\pm$ DP para os VCM também foi significativa entre os 3 grupos: SS -  $VCM=87,01\pm6,96\text{fl}$ ; SC -  $VCM=70,25\pm6,41\text{fl}$  e S-tal $\beta$  -  $VCM=63,65\pm3,66\text{fl}$  ( $p<0,001$ ). Tantos os valores de VCM dos pacientes do Estado do Paraná quanto os valores de hemoglobina seguem os descritos na literatura (MARCUS *et al.*, 1997; GONÇALVES *et al.*, 2003; FLEURY, 2007; BELISARIO *et al.*, 2010), Entretanto, Galiza-Neto *et al.* (2005) encontraram VCM com valores superiores aos descritos nos outros pacientes;  $VCM:105,57\pm10,05\text{fl}$ , que pode ocorrer por reticulocitose mais intensa nos pacientes SS. Apesar da reticulocitose ( $17,30\pm5,57\%$ ), nos pacientes SS no Paraná, o VCM manteve-se dentro da média encontrada nos outros serviços, condizente com a classificação morfológica da AF como normocítica e normocrômica (NAOUM; NAOUM, 2004).

A concentração de HbF foi menor para o grupo SC e mais alta para o grupo SS ( $p<0,001$ ); a porcentagem de reticulócitos foi menor na doença SC seguida pela SS, em concordância com os dados encontrados por Zago e Silva Pinto (2007) em São Paulo, com maiores valores sendo encontrados na HbSS ( $p<0,001$ ).

A contagem de leucócitos se mostrou mais elevada no gênero masculino ( $p=0,043$ ) o que está de acordo com Kuzolik *et al.* (1986). A contagem elevada de leucócitos, excluídos os processos infecciosos, está relacionada com a resposta inflamatória crônica causado pelo recrutamento crônico e constante dos neutrófilos e monócitos (QUEIROZ; LIMA, 2013).

No Paraná, os valores de HbF foram mais altos nos pacientes do grupo feminino do que no grupo masculino ( $p=0,031$ ). Samarah *et al.* (2007), baseando-se nos estudos de Powars *et al.* (1994) sugerem que o sexo poderia influenciar no desenvolvimento da doença, pois pacientes femininos teriam maior produção de HbF independentemente do haplótipo, como reflexo de fatores hormonais que interagem com a região regulatória do gene no DNA, ou pela relativa persistência da HbF relacionada a genes localizados no cromossomo X. Apesar de não estar totalmente esclarecido, seria responsável pela maior longevidade do gênero feminino (FLEURY, 2007). Rahimi *et al.* (2011) concordam com os achados de Samarah e Fleury, pois não são apenas os haplótipos que interferem nos níveis de HbF e na gravidade da doença, mas outros fatores e genes não ligados ao grupamento do gene da globina  $\beta$  também podem estar envolvidos.

No estudo de POWARS *et al.*, 1994 os, pacientes com a combinação CAR e BEN (HbF=  $6,9\pm 4,0$ ) apresentaram valores mais baixos de HbF e quadro clínico mais graves quando comparados ao genótipo CAR/CAR (HbF= $7,4\pm 4,45$ )(4), contrários aos resultados encontrados no estado do Paraná.

No Rio de Janeiro, Silva Filho, 2012 avaliou 73 crianças SS, (0 a 6,6 anos de idade) . A média da HbF= $11,9\pm 5,3$  (IC= $10,2-13,8$ ) das crianças CAR/CAR (n=39) foi inferior à média das crianças CAR/BEN (n=32) (HbF= $16,1\pm 8,1$ ) (IC= $12,9-19,2$ ). Apesar da HbF dos pacientes CAR/CAR do Rio de Janeiro ser numericamente maior do que a do Paraná do presente estudo, não apresentou diferença significativa ( $p=0,106$ ). Entre os genótipos CAR/BEN a média da HbF do Rio de Janeiro foi semelhante ao presente estudo ( $p=0,790$ ). A semelhança nos resultados obtidos pelo estado do Paraná e do Rio de Janeiro é esperada pois historicamente, africanos do grupo étnico banto, da região da atual República Centro Africana tiveram entrada no Brasil pelo porto do Rio de Janeiro, nos séculos XVIII e XIX. Posteriormente, foram distribuídos para São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além do Espírito Santo, norte fluminense e São Paulo (FLORENTINO, RIBEIRO, da SILVA, 2004).

TABELA 15 COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE HbF NOS GENÓTIPOS SS NO PARANÁ DO PRESENTE ESTUDO E NO RIO DE JANEIRO

Genótipo HbF	Paraná (WATANABE <i>et al.</i> , 2015)		Rio de Janeiro (SILVA-FILHO, <i>et al.</i> , 2012)		$p$
	(%)	N	(%)	N	
CAR/CAR	9,6±6,54	32	11,9±5,3	39	0,106
CAR/BEN	16,85±6,28	10	16,1±8,1	32	0,790
BEN/BEN	16,33±5,63	3	15,9±14,4	2	0,963
total	-	45	-	73	-

Teste  $t$  – amostras independentes, dados resumidos

Na comparação entre a HbF dos genótipos CAR/CAR ( $p=0,106$ ); CAR/BEN ( $p=0,790$ ) e BEN/BEN ( $p=0,963$ ), entre os pacientes do Paraná e do Rio de Janeiro, foram observados que tanto no Paraná quanto no Rio de Janeiro, HbF elevada, que sugere que os pacientes possam ter quadro clínico mais brando (Tabela 15).

No grupo de pacientes com HbSS do estado do Paraná analisados neste estudo, o grupo CAR/BEN apresentou média superior de concentração de HbF em relação ao grupo CAR/CAR ( $p=0,004$ ) (Tabela 16). Em relação à HbF, não houve diferença significativa na produção da HbF do genótipo BEN/BEN em relação ao CAR/CAR ( $p=0,095$ ) provavelmente decorrente do tamanho da amostra ( $n=3$ ). O mesmo pode ter ocorrido quando se comparou a HbF entre o grupos CAR/BEN com o BEN/BEN ( $p=0,900$ ).

TABELA 16 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE HbF ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS SS, NO ESTADO DO PARANÁ

GENÓTIPOS (n)	HbF (MÉDIA±DP)	$P^{(*)}$
CAR/CAR (32) X CAR/BEN (10)	9,6±6,54X16,85±6,28	0,004
CAR/CAR (32) X BEN/BEN (3)	9,6±6,54x16,33±5,63	0,095
CAR/BEN (10) X BEN/BEN (3)	16,85±6,28x16,33±5,63	0,900
CAR/CAR (32) X CAR/Satp (4)	9,6±6,54 X16,18±9,89	0,081

FONTE: A autora

NOTA: (\*) Teste “ $t$ ” de Student

BELISARIO, 2010<sup>a</sup> em Minas Gerais, sequenciou as regiões  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  de 10 pacientes cujos genótipos apresentavam discrepância entre a concentração de HbF e o haplótipo/genótipo. Para o sequenciamento das regiões estudadas foram selecionados, dois genótipos CAM/BEN, dois BEN/BEN, três BEN/CAR, dois CAR/CAR e um CAR/Satp. Na região controladora do locus HS2 havia uma substituição de um nucleotídeo (G→A) na posição -10.677, para os pacientes com o haplótipo BEN e concentrações de HbF elevadas. Aqueles com genótipos CAR/BEN e BEN/BEN e baixas concentrações de HbF não tinham esta sequência variante, mostrando que polimorfismos dentro do mesmo haplótipo, podem provocar alterações na resposta fenotípica (BELISARIO, 2010<sup>a</sup>).

Em relação aos outros parâmetros hematológicos, como a hemoglobina média, VCM, leucócitos, contagem de plaquetas e reticulócitos, nos pacientes do presente estudo, não houve diferença significativa entre os genótipos estudados, com exceção do grupo CAR/Satp cujos valores de reticulócitos foram mais baixos do que nos outros grupos ( $p=0,006$ ), sugerindo menor grau de hemólise.

O AVC é uma grave complicação da doença falciforme e é mais frequente na doença da HbS em homozigose do que nas outras e crianças na idade de 2 a 16 anos são as que estão no grupo de risco (SILVA FILHO *et al.*, 2011). Na casuística do presente estudo, o AVC ocorreu apenas no grupo SS, com 2,1% de eventos nas crianças abaixo de 3 anos e 8,7% nas crianças acima de 3 anos de idade e adolescentes.

A presença de pelo menos um alelo com haplótipo falciforme atípico se associou com maior frequência ao AVC do que nos outros genótipos; houve maior frequência de AVC no grupo CAR/Satp (25%) do que no CAR/CAR (12,5%); sendo mais frequente em crianças acima de 3 anos de idade ( $p=0,160$ ). Estes resultados são diferentes do grupo de pacientes SS da Bahia analisados por Lyra *et al.* (2005), que encontrou maior frequência de AVC em pacientes CAR/BEN em Salvador e CAR/CAR em São Paulo, porém são semelhantes ao descrito por Sarnaik e Ballas (2001). Para estes autores, a presença de pelo menos um haplótipo atípico mostrou se associar a maior frequência de AVC. Entretanto, analisando-se a concentração de HbF, esperar-se-ia menor ocorrência de AVC nos pacientes com genótipo CAR/Satp ( $HbF = 16,2 \pm 9,9$   $p < 0,001$ ) do que o nos pacientes com o genótipo CAR/CAR cuja  $HbF = 9,6 \pm 6,5$   $p < 0,001$ . Silva Filho *et al.* (2011) encontraram resultados opostos, nos pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: houve maior frequência de AVC entre crianças CAR/CAR (11/22 - 50%) do que nas crianças CAR/Satp (7/22-31,8%), sugerindo que a HbF não é a única moduladora da gravidade clínica.

A talassemia  $\alpha$ , representada pela deleção de 3,7 kb, é encontrada de forma frequente na população africana e também está presente em todos os estudos no Brasil. Nos pacientes analisados por Sarnaik e Ballas (2001), os pacientes que possuíam o genótipo de 4 a 5 cadeias alfa  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  ou  $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$  desenvolveram mais AVC, sugerindo que o excesso de cadeias  $\alpha$  pode representar um fator de risco para essa complicação. Por outro lado, as deleções são benéficas. Em Minas Gerais, a deleção da talassemia  $\alpha^{3,7}$  kb em homo ou heterozigose foi encontrada em quase 30% de 221 recém-nascidos com o fenótipo neonatal FS. Naquelas crianças os parâmetros hematológicos foram associados a valores mais baixos de VCM, HCM, leucócitos e reticulócitos, sem influenciar nas concentrações de Hb total, HbF e contagem de plaquetas (BELISÁRIO; VIANA, 2011; OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013); a presença da deleção talassêmica  $\alpha$  esteve fortemente associada à diminuição do risco de doença cérebro-vascular (BELISÁRIO; VIANA, 2011).

A genotipagem dos pacientes do Paraná para a talassemia  $\alpha$  vem sendo motivo de estudo de dissertação de mestrado e trará maiores informações em relação ao quadro clínico das doenças falciformes.

Os pacientes com genótipo SS, S $\beta$ , ou SC apresentaram crises de dor por vaso-oclusão; não houve diferença estatisticamente significativa quanto à maior concentração de hemoglobina e contagem mais baixa de reticulócitos (S $\beta$  e SC) ou por menor concentração de hemoglobina e contagem de reticulócitos mais elevadas (SS), bem como quanto à faixa etária, para os grupos de crianças até os 3 anos de idade ou mais. Foram analisados os dados de pacientes que não haviam sido submetidos à transfusão, por pelo menos três meses previamente à análise.

Quanto mais baixa a concentração de HbF, mais frequentes foram as crises algicas (90,6%), sendo as dactilites (51%) ( $p < 0,001$ ) e sequestro esplênico (27,66%) mais frequentes nas crianças abaixo de 3 anos ( $p < 0,001$ ) predominando nos pacientes SS, resultados concordantes com os de Costa *et al.* (2006). A concentração de HbF diminui a ocorrência das polimerizações, consequentemente diminuindo as crises de dor e os eventos vaso-oclusivos, sendo por isso considerada um marcador da gravidade da doença.

Mutações na região da globina  $\gamma^G$  recentemente identificadas como *QTL-quantitative trait loci* podem estar envolvidas no aumento da concentração de HbF. O primeiro QTL conhecido é o XmnI-HbG2 no gene da  $\gamma$  globina além de 2 outros loci: HBS1L-MYB na região intergênica de 6q e BCL11A. Polimorfismos comuns nestes 3rQTLs influenciam na variação das concentrações de HbF, comparando-se os indivíduos normais e com os portadores de PHHF (SILVA FILHO *et al.*, 2011).

Em relação aos pacientes CAR/Satp analisados no presente trabalho, apesar de não ter sido encontrado o polimorfismo XmnI na região 5' $\gamma^G$  do haplótipo Satp, apresentaram concentrações maiores de HbF ( $16,2 \pm 9,9\%$ ) ( $p < 0,001$ ) e relativamente menor produção de reticulócitos ( $8,9 \pm 6,0\%$ ) ( $p = 0,006$ ), sugerindo que outros polimorfismos estimulem a produção da HbF.

O único genótipo CAR/SENEGAL identificado neste grupo de pacientes, mostrou ser Hb SS na eletroforese. Não foi possível a análise dos pais pois a criança é adotada. O resultado da Hb  $A_2 = 2,1\%$  sugere concordância com a eletroforese de hemoglobina. Outros achados laboratoriais foram: Hb =  $7,57 \text{ g/dL}$  e HbF =  $12,30\%$ , reticulócitos =  $22,1\%$ , VCM =  $90,5 \text{ fl}$ . Clinicamente, apresentou manifestações graves e fenômenos vaso-oclusivos. Não foi analisada a presença da talassemia  $\alpha$ . Curiosamente, um paciente com o genótipo BEN/SEN identificado no Hospital Universitário do Ceará, em Fortaleza (GALIZA NETO *et al.*, 2005) apresentou Hb =  $8,9 \text{ g/dL}$ ; HbF =  $13,4\%$ ; VCM =  $92 \text{ fL}$ . Estes parâmetros hematológicos são semelhantes aos da amostra do Paraná e aos descritos por Nagel *et al.* (1991), que analisando 60 pacientes com um dos haplótipos SENEGAL encontraram valores de hemoglobina =  $9,6 \pm 1,1 \text{ g/dL}$ , VCM =  $91,2 \pm 9,2 \text{ fL}$  e HbF =  $9,9 \pm 5,4\%$ . Nestes pacientes, tanto o risco de AVC quanto alterações cardíacas podem ser considerados menores devido à concentração de HbF ser mais alta.

No Rio de Janeiro, Fleury (2007) encontrou um paciente CAR/SEN (3 anos) com HbF =  $21,6\%$  e outro BEN/SEN (17 anos) com HbF =  $6,8\%$ . Apesar do haplótipo SENEGAL ser mais brando, a heterozigose com haplótipos CAR ou BEN pode se manifestar de maneiras distintas.

O haplótipo SENEGAL em homozigose usualmente apresenta quadro clínico brando, particularmente em relação à hemólise (NAGEL *et al.*, 1991) e com concentrações aumentadas de HbF (SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI, 2007). Porém a associação com o haplótipo CAR mostra que a heterozigose pode ser clinicamente mais grave, como ocorre com a única amostra analisada do Paraná. No grupo de pacientes estudados por Nagel *et al.* (1991), as dosagens de bilirrubina total e indireta foram menores nos grupos que continham o haplótipo Senegal, concordante com menor grau de hemólise do que nos grupos contendo outros haplótipos.

Os pacientes SC do Paraná, além de apresentarem concentrações menores de HbF ( $4,9 \pm 4,3$ ) ( $p < 0,001$ ) tiveram concentrações de Hb ( $10,5 \pm 1,0$ g/dL) ( $p < 0,001$ ) mais altas, que são também fatores potencializadores da polimerização, podendo concorrer para maior gravidade clínica. Segundo Powars (2002), a anemia mais branda, (com hemoglobina em torno de 10g/dL) não estimula a produção de HbF. As alterações cardíacas ocorreram com maior frequência nas crianças de idade maior que 3 anos ( $p < 0,037$ ) com predominância nos grupos CAR/CII (33,3%) CAR/CI (20%), e BEN/CI (14,2%). Não houve ocorrência de AVC nestes grupos; os sinais de vaso-oclusão foram evidentes em todos os grupos SC: ocorrendo em 80% dos CAR/CI; e em 100% dos CAR/CII e CAR/CIII, BEN/CII e Satp/CI. Estes resultados devem ser analisados com cautela devido ao pequeno número de pacientes para estes genótipos. A dactilite ocorreu em 10% de CAR/CI, em 36,3% de CAR/CII e, em menor frequência, nos pacientes com genótipo BEN/CI; verificou-se conforme esperado, maior ocorrência nas crianças abaixo de 3 anos ( $p = 0,238$ ).

Nagel, Fabry e Steinberg (2003) descrevem que os haplótipos do gene da globina  $\beta^C$  em combinação com o haplótipo BEN, em geral, estão associados com menores concentrações de HbF, o que ocorreu nos pacientes BEN/CI do Paraná ( $3,9 \pm 3,6\%$ ). No único caso analisado de BEN/CII, a concentração de HbF foi de 9,5% e apresentou crises de vaso-oclusão e pneumopatia.



Cajado *et al.* (2010) analisaram os haplótipos de 63 pacientes duplo heterozigotos SC (126 cromossomos), atendidos no Hemocentro da Bahia (HEMOBA) e obtiveram os seguintes resultados: BEN/CI:46,1%; BEN/CII:11,1%; CAR/CI:31,7%; CAR/CII:7,9%; Satp/CI:3%, Satp/CII: 0%. Na experiência desses autores, de 7 pacientes com retinopatia, com idades variando de 26 a 57 anos, 4 eram BEN/CI, 1 BEN/CII e 2 CAR/CII (CAJADO *et al.*, 2010). Os valores encontrados para hemoglobina foram  $10,9 \pm 1,7$ g/dL e para o VCM  $79,9 \pm 11,3$ fL; a média da concentração de HbF foi de 3,06%. Diferentemente do Estado do Paraná, os pacientes BEN/CI da Bahia apresentaram mais eventos dolorosos do que os pacientes BEN/CII e também em relação aos outros genótipos.

Nos pacientes com interação S-talassemia  $\beta$ , as alterações cardíacas foram mais frequentes no grupo CAR/ $\beta$ II(33%) e CAR/ $\beta$ atp(12,5%). Em relação à vaso-oclusão, 3/3 CAR/ $\beta$ I, 1/1 BEN/ $\beta$ I, 1/1 BEN/ $\beta$ II e 2/2 CAR/ $\beta$ VI apresentaram dores que foram registradas nos prontuários; 83,3%, 75% e 62,5% de CAR/ $\beta$ II, CAR/ $\beta$ IX, CAR/ $\beta$ atp, respectivamente, também apresentaram dores relativas à vaso-oclusão. Alterações pulmonares indicativas de STA foram encontradas em 33,3% dos pacientes CAR/ $\beta$ I, 1/1 BEN/ $\beta$ II e Satp/  $\beta$ I, 50% CAR/ $\beta$ II e CAR/ $\beta$  atp e em 2/2 CAR/ $\beta$ VI. Não houve diagnóstico de AVC no grupo estudado. Além disso, a dactilite foi mais frequente em crianças abaixo de 3 anos ( $p=0,241$ ). O sequestro esplênico ocorreu nas crianças abaixo de 3 anos (8,69%) e acima de 3 anos (14,29%), sem diferença significativa quanto à idade ( $p=0,523$ ).

O genótipo CAR/ $\beta$ VI associou-se à concentrações de HbF (média $\pm$ DP= $1,25 \pm 1,48$ ) significativamente mais baixas do que a dos outros genótipos ( $p=0,055$ ), menor reticulocitose ( $2,03 \pm 0,30$ ) ( $p=0,226$ ) e concentrações de Hb maiores:  $10,25 \pm 1,20$  ( $p=0,545$ ). Clinicamente, apresentaram episódios de dor por vaso-oclusão e pneumopatias. Não houve manifestação de alterações cardíacas, AVC, sequestro esplênico nem mesmo dactilites (Tabela 9).

Para Miller *et al.* (2000), a dactilite, anemia grave e leucocitose nos dois primeiros anos de vida auxiliariam a estabelecer prognóstico da gravidade clínica da

doença falciforme ao longo da vida. Para Steinberg (2005), nos países em desenvolvimento onde a maioria dos pacientes SS são heterozigotos para os diferentes haplótipos e a miscigenação é a regra, a associação entre o valor prognóstico do haplótipo em relação ao efeito clínico torna-se mais vaga. Este pesquisador concluiu que não era viável reunir os achados laboratoriais e clínicos da anemia falciforme em um modelo previsível para o entendimento clínico-laboratorial; questionou também se o haplótipo estaria relacionado à gravidade da doença pois os trabalhos iniciais foram realizados com populações homozigotas para cada haplótipo descrito. Na África, os nativos para um determinado haplótipo são homozigotos para o mesmo, diferentemente do que ocorre nas Américas.

A grande miscigenação entre a população de africanos trazidos ao continente americano no processo escravagista resultou em doenças falciformes heterozigotas para dois dos três haplótipos mais comuns (NAGEL *et al.*, 1991; SAMARAH; ATHANASIOU-METAXA; VAVATSI-CRHISTAKI; 2007), além dos polimorfismos que vão trazendo, ao longo do tempo, diferenças sutis demonstrado por BELISARIO, 2010<sup>a</sup>, no sequenciamento de alguns haplótipos mostrando pequenas mutações pontuais que alteraram as concentrações de HbF para um determinado haplótipo.

As publicações de Labie *et al.* (1985b), de Nagel *et al.* (1987) e de Loggetto (2013), têm mostrado que o haplótipo CAR apresenta as menores concentrações de HbF (SILVA FILHO *et al.*, 2012); e o SEN e ÁRABE-INDIANO, as mais elevadas, enquanto que o BEN apresenta concentrações intermediárias, influenciadas pelos polimorfismos na região do gene da globina  $\gamma$  (SILVA FILHO *et al.*, 2011). Historicamente, a HbF é considerada um modulador genético para a AF isto é, um elemento que atenua os sintomas da doença, confirmada pelo uso da HU (ZAGO; SILVA PINTO, 2007). Em um grupo de pacientes com anemia falciforme de São José do Rio Preto e do Rio de Janeiro, Silva *et al.* (2013), encontraram maior frequência do genótipo CAR/BEN. Neste grupo de pacientes, o uso da hidroxiuréia mostrou efeito protetor confirmado pela diminuição dos níveis de peroxidação dos lipídios (SILVA *et al.*, 2013).

Inati *et al.* (2003) referem que a HbF não é o único modulador da gravidade clínica na doença falciforme pois pacientes no Líbano com concentrações mais altas

de HbF, apresentavam maior gravidade clínica. Naqueles pacientes, não houve diferença significativa nas concentrações de HbF para os haplótipos que possuíam o polimorfismo XmnI dos que não possuíam, demonstrando que outros fatores, além deste polimorfismo influenciam nessa variável.

Da mesma forma os pacientes HbSS do Paraná, com haplótipo CAR, mesmo não apresentando níveis de HbF muito baixos, apresentaram sinais e sintomas mais graves em relação aos outros haplótipos, reforçando a hipótese de que o quadro clínico é resultado da interação de inúmeras variáveis. Para enfatizar esta análise, Loggetto (2013), sugere que outros polimorfismos situados nas diferentes regiões do gene  $\beta$  como, por exemplo, da via TGF- $\beta$ /BMP onde os haplótipos em BMPR1B (gene do receptor da proteína morfogenética óssea) estão associados a maior taxa de filtração glomerular na AF ou a associação entre 844ins68 CBS (polimorfismo do gene da enzima cistationa  $\beta$  -sintetase-CBS) e MTHFR C677T (polimorfismo genético do gene da enzima milenotetrahidrofolato redutase-MTHFR) possam ter mais influência na melhora ou piora dos pacientes do que a concentração de HbF.

Com o avanço da tecnologia, estes fatos poderão ser esclarecidos e trazer novas hipóteses fisiopatológicas.

A técnica de RFLP possui 100% de especificidade desde que os *primers* desenhados sejam os corretos (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006). A frequência de 5,5% de haplótipo atípico da  $\beta^S$  pode ser decorrente de sobreposições entre sítios de restrições da globina  $\beta^S$ , da talassemia  $\beta$  ou da hemoglobina normal que poderão ser esclarecidas com o uso de técnicas adicionais. O sequenciamento molecular é uma das ferramentas que pode auxiliar no esclarecimento dos polimorfismos. A técnica *FRET Light Cyclor* (transferência da energia da ressonância por fluorescência) e *HRM assays* (ensaio de fusão de alta resolução) podem ser alternativas para a genotipagem dos haplótipos da globina S (JOLY *et al.*, 2011).

## 6. CONCLUSÕES

Analisando-se os 194 pacientes com doença falciforme atendidos nos ambulatórios de Hematopediatria do HC-UFPR e do HEMEPAR, o presente estudo permitiu identificar, em relação à distribuição dos haplótipos da HbS, que:

- 1) O haplótipo da HbS mais frequente no Estado do Paraná é o CAR (57,2%), seguido pelo BEN(14,4%) e em menor proporção, SEN e CAM (0,26%) cada um. A frequência dos haplótipos atípicos da HbS é de 3,6%. Em relação aos haplótipos da HbC houve predomínio do haplótipo CI (10,3%); os haplótipos predominantes na S-talassemia  $\beta$  foram  $\beta I$  e  $\beta atp$ , com frequência 3,6% cada. Houve maior distribuição dos haplótipos da HbS na capital e por todo o Estado do Paraná, enquanto que a S-talassemia  $\beta$  e a doença SC concentraram-se na região norte do estado. Houve predomínio do genótipo CAR/CAR na 2.<sup>a</sup> Regional de Saúde.
- 2) A maior frequência do haplótipo CAR encontrada no estado do Paraná está em concordância com os registros históricos que mostram que os africanos residentes neste Estado nos séculos XVIII e XIX foram trazidos da região da República Centro-Africana.
- 3) Não houve associação dos haplótipos com a gravidade clínica.
- 4) A dactilite predominou de forma estatisticamente significativa em crianças com o genótipo SS até os 3 anos de idade ( $p < 0,001$ ); as alterações cardíacas foram diagnosticadas principalmente acima dos 3 anos de idade e para crianças com doença SS e SC; já o sequestro esplênico ocorreu em crianças até os 3 anos de idade com o genótipo SS.
- 5) A gravidade clínica não é dependente exclusivamente da HbF; polimorfismos resultantes da miscigenação podem interferir na expressão do gene, bem como as deleções da talassemia  $\alpha$ .

## REFERÊNCIAS

- ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, L.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.3, p.621-625, 2008.
- AKINSHEYE, I.; ALSUTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALWIN, C. T.; SEBASTIANI, P.; CHUI, D. H. K.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, n.1, v.118, p.19-27, 2011.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKINS, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- AL-SOUD, W. A.; RADSTROM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.2, p.485-93, 2001.
- ANGASTINOTIS, M.; MODELL, B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.850, p.251-269, 1998.
- ANTONARAKIS, S. E.; BOEHM, C. D.; GIARDINA, P. J. V.; KAZAZIAN JR., H. H. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene cluster. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, n.1, p.137-141. 1982.
- ANTONARAKIS, S. E.; BOEHME, C. D.; SERJEANT, G. R.; THEISEN, C. E.; DOVER, G. J.; KAZAZIAN, H. H. Origin of the  $\beta$ -globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, n.3, p.853-856, 1984.
- ATAGA, K. I.; BRITTAIN, J. E.; DESAI, P.; MAY, R.; JONES, S.; DELANEY, J.; STARYHORN, D.; HINDERLITER, A.; KEY, N. S. Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. **PLoS One**, v.7, n.1, p.1-9, 2012.
- ATAGA, K. I.; KEY, N. S. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. **Hematology**, v.1, p.91-96, 2007.
- BAHADIR, A.; OZTURK, O.; ATALAY, A.; ATALAY, E. O.  $\beta$  globin gene cluster haplotypes of the  $\beta$ -thalassemia mutations observed in the Denizli province of Turkey. **Turkish Journal of Hematology**, v.26, n.3, p.129-137, 2009.
- BALHANA, A. P. Política imigratória do Paraná. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, n.87, p.39-50, 1996.
- BALLAS, S. K.; LIEFF, S.; BENJAMIM, L. J.; DAMPIER, C. D.; HEENEY, M. M.; HOPPE, C.; JOHNSON, C. S.; ROGERS, Z. R.; SMITH-WHITLEY, K.; WANG, W. C.; TELEN, M. J. Definitions of the phenotypic manifestations of the sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v.85, n.1, p.6-13, 2010.

BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BELINI, E. J.; CANÇADO, R. D.; DOMINGOS, C. R. B. The XmnI polymorphic site 5' to the  $\gamma^G$  in a Brazilian patient with sickle cell anaemia - fetal haemoglobin concentration, haematology and clinical features. **Archives of Medical Science**, v.6, n.5, p.822-825, 2010.

BELISÁRIO, A. R. **Genótipos da talassemia alfa e haplótipos do agrupamento de genes da globina beta como moduladores da gravidade na doença falciforme em crianças do Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais**. 177p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2010a.

BELISARIO, A. R.; MARTINS, M. L.; BRITO, M. A. S.; RODRIGUES, C. V.; SILVA, C. M.; VIANA, M. B.  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or  $S\beta^0$ -thalassemia and their association with clinical and hematological features. **Acta Haematologica**, v.124, n.3, p.162-170, 2010b.

BELISARIO, A. R.; VIANA, M. B. Efeitos da alfa-talassemia nas manifestações clínicas e hematológicas da anemia falciforme: uma revisão sistemática. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.21, n.3, p.319-330, 2011c.

BEZERRA, M. A. C. **Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do estado de Pernambuco**. 114 p. Dissertação (Mestrado) - Unicamp, Campinas, 2007.

BHAGAT, S.; PATRA, P. R.; THAKUR, A. S. Fetal haemoglobin and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes among sickle cell patients in Chhattisgarh. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.2, p.269-272, 2013.

BIORAD - PCR TROUBLESHOOTING APPLICATION. Disponível em: <[www.biorad.com/pt-br/applications-technologies/pcr-troubleshooting](http://www.biorad.com/pt-br/applications-technologies/pcr-troubleshooting)>. Acesso em: 1.º jan. 2014.

BOEHM, C. D.; DOWLING, C. E.; ANTONARAKIS, S. E.; HONIG, G. R.; KAZAZIAN JR., H. H. Evidence supporting a single origin of the  $\beta^C$  globin gene in blacks. **American Journal of Human Genetics**, v.37, n.4, p.771-777, 1985.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n.11, p.762-769, 1997.

CABRAL, C. H. K. **Determinação de haplótipos do gene  $\beta^S$  em pacientes com anemia falciforme**. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

CAJADO, C.; BARBOSA, C.; ADORNO, E. V. A.; MENESES, J. F. M.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Sick cell disease SC in northeast of Brazil: a clinical and molecular characterization. **Gazeta Médica da Bahia**, v.80, n.3, p.20-23, 2010.

CAMERON, B. F.; CRISTIAN, E.; LOBEL, J. S.; GASTON, M. H. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. **Journal of the National Medical Association**, v.75, n.5, p.483-487, 1983.

CARVALHO, M. J. M. **Liberdade**: rotinas e rupturas do escravismo. Recife, 1822-1850. Recife: Editora Universitária da UFPE, 1998.

CASTRO, O.; BRAMBILLA, D. J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C. A.; SCOTT, R. B.; GILLETTE, P.; VERA, J. C.; LEVY, P. S. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. **Blood**, v.84, n.2, p.643-649, 1994.

CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOORE, R. D.; ECKERT S.; BALLAS, S. K.; KOSHY, M.; MILNER, P. F. A.; ORRINGER, E. P.; PHILIPS, G.; PLATT, O. S.; THOMAS, G. H. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v.79, n.10, p.2555-2565, 1992.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v.64, n.1, p.74-80, 2012.

CONRAM, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v.33, p.1-16, 2009.

COSTA, P. J. M. S.; VILELA, R. Q. B.; CIPOLOTTI, R.; FIGUEIREDO, M. S. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo Bantu da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.1, p.1-5, 2006.

CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D. A. Definitions and clinical importance of haplotypes. **Annual Review of Medicine**, n.56, p.303-320, 2005.

DAAR, S.; HUSSAIN, M. H.; GRAVELL, D.; NAGEL, R. L.; KRISHNAMOORTHY, R. Genetic epidemiology of HbS in Oman: multicentric origin for the  $\beta^S$  gene. **American Journal of Hematology**, v.64, n.1, p.39-46, 2000.

DAVIES, S. C.; ROBERTS-HAREWOOD, M. Blood transfusion in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v.11, n.2, p.57-71, 1997.

DE FRANCESCHINI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, v.89, n.3, p.348-356, 2004.

DESAI, D. V.; DHANANI, H. Sickle cell disease: history and origin. **The Internet Journal of Hematology**, v.1, n.2, 2004.

DOMINGOS, M. T.; OLIVEIRA, C.; WITTIG, O. E. **Manual técnico de coleta para o teste do pezinho**. Curitiba, PR: SRTN PR, 2013.

EL-HAZMI, M. A. F.; AL-HAZMI, A. M.; WARSY, A. S. Sick cell disease in middle east arab countries. **The Indian Journal of Medical Research**, v.134, n.5, p.597-610, 2011.

ELION, J.; BERG, P. E.; LAPOUMÉROULIE, C.; TRABUCHET, G.; MITTELMAN, M.; KRISHNAMOORTHY, R.; SCHECHTER, A. N.; LABIE, D. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the  $\beta$ -globin gene correlates with the phenotypic expression of the  $\beta^S$  mutation. **Blood**, v.79, n.3, p.787-792, 1992.

ELLISON, A. M.; BAUCHNER, H. Socioeconomic status and length of hospital stay in children with vaso-occlusive crises of sickle cell disease. **Journal of the National Medical Association**, v.99, n.3, p.192-196, 2007.

ENDMEMO para conversão das unidades de medidas usadas no preparo dos reativos para BM. Disponível em: <<http://www.endmemo.com>>. Acesso em: 05 maio 2012.

EPPENDORF. **PCR primer-annealing temperature**. Disponível em: <<http://www.eppendorf.com/script/cms-newspic.php?id=2365&inline=1&col=DOWNLOADFILE>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

FARAH, S. B. **DNA: segredos e mistérios**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

FARIAS, S. C. Cotidiano do negro no Brasil escravista. In: ANDRÉS-GALLEGO, J. (Org.). **Tres Grandes Cuestiones de la Historia de Iberoamérica; ensayos y monografias**. Madrid: Fundación Mapfre Tavera - Fundación Ignacio Larremendi, v.1. p.13, 2005.

FERNANDES AP, JANUÁRIO JN, CANGUSSU CB, MACEDO DL, VIANA MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. **Jornal de Pediatria**. v. 86, n. 4, p. 279-84, 2010.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.39, n.2, p.89-93, 2007.

FLORENTINO, M.; RIBEIRO, A. V.; da SILVA, D. D. Aspectos comparativos do tráfico de africanos para o Brasil (séculos XVIII e XIX). **Afro-Asia**, n.31, p.83-126, 2004.

FRANCESCHINI, L; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, n.89, v.3, p.348-356, 2004.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, news concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.4, p.850-858, 2007.

GABRIEL, A.; PRZYBYLSKI, J. Sickle cell anemia: a look at global haplotype distribution. **Nature Educations**, v.3, n.3, p.1-7, 2010.

GALIZA-NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S.; VIEIRA, H. F.; VIEIRA, M. L. C., FARIAS, D. A. B. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta^S$ -globina no Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.5, p.315-321, 2005.



GHANSAH, A.; ROCKETT, K. A.; CLARK, T. G.; WILSON, M. D.; KORAM, K. A.; ODURO, A. R.; AMENGA-ETEGO, L.; ANYORIGIYA, T.; HODGSON, A.; MILLIGAN, P.; ROGERS, W. O.; KWIATKOWSKI, D. P. Haplotypes analyses of haemoglobin C and hemoglobin S and the dynamics of the evolutionary response to malaria in Kassena-Nankana District of Ghana. **PLoS One**, v.7, n.4, p.1-8, 2012.

GILMAN, J. G.; HUISMAN, T. H. J. Two independent genetic factors in the  $\beta$ -globin gene cluster are associated with high  $\gamma^G$  levels in the HbF of SS patients. **Cellular and Molecular Biology**, n.813, p.452-457, 1984.

GILMAN, J. G.; HUISMAN, T. H. J. DNA sequence variation associated with elevated fetal  $\gamma^G$  globin production. **Blood**, v.66, p.783-787, 1985.

GLADWIN, M. T.; VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, n.359, v.21, p.2254-2265, 2008.

GONÇALVES, M. S.; BONFIM, G. C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; BONFIM, G.; ADORNO, E. V.; ALBURQUERQUE, A. L.; PONTES, A.; DUPUIT, M. F.; FERNANDES, G. B.; DOS REIS, M. G.  $\beta^S$ -haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.10, p.1283-1288, 2003.

GUERREIRO, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; SANTOS, S. E. B.; ZAGO, M. A.  $\beta$  gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. **Human Genetics**, v.89, n.6, p.629-631, 1992.

GUPTA, A.; SARWAI, S.; PATHAK, N.; AGARWAL, S.  $\beta$ -globin gene mutations in India and their linkage to  $\beta$ -haplotypes. **International Journal of Human Genetics**, v.8, n.1-2, p.237-241, 2008.

GUTIERREZ, H. Crioulos e africanos no Paraná (1798-1830). **Revista Brasileira de História**, v.8, n.16, p.161-188, 1988.

GUTIERREZ, H. Donos de terras e escravos no Paraná: padrões e hierarquias nas primeiras décadas do século XIX. **História**, v.25, n.1, p.100-122, 2006.

HANCHARD, N.; ELZEIN, A.; TRAFFORD, C.; ROCKETT, K.; PINDER, M.; JALLOW, M.; HARDING, R.; KWIATKOWSKI, D.; MCKENZIE, C. Classical sickle  $\beta$ -globin haplotypes exhibit a high degree of long range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations. **BMC Genetics**, v.8, n.52, p.1-11, 2007.

HARTUNG, M. Muito além do céu escravidão e estratégia de liberdade no Paraná do século XIX. **TOPOI**, n.10, v.6, p.143-191, 2005.

HBE1 HEMOGLOBIN, EPSILON 1. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3046>>. Acesso em: 22 jan. 2011.

HEBBEL, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v.77, n.2, p.214-237, 1991.

HENNEBERG, R.; OTUKI, M. F.; FURMAN, A. E. F.; NASCIMENTO A. J.; LEONART, M S. S. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.1, n.35, p.25-55, 2013.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, v.15, p.517-521, 1910 IN: **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.74, n.3, p.179-184, 2001.

HIRATA, M. H.; TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Medicina**, v.39, n.4, p.522-534, 2006.

INATI, A.; TAHER, A.; ALAWI, W. B.; KOUSSA, S.; KASPAR, H.; SHBAKLO, H.; ZALLOUA, P. A.  $\beta$  globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. **European Journal of Haematology**, v.70, n.2, p.79-83, 2003.

INGRAM, V. M. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nature**, v.180, n.4581, p.326-328, 1957.

INGRAM, V. M. Sickle-cell anemia hemoglobin: the molecular biology of the first "molecular disease"- the crucial importance of serendipity. IN: CROW, F. J.; DOVE, W. F. Perspectives - Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics - **Genetics Society of América**, v.167, n.1, p.1-7, 2004.

JINKS, D. C.; MINTER, M.; TARVER, D. A.; VANDERFORD, M.; HEJTMANCIK, J. F.; McCABE, E. R. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. **Human Genetics**, v.81, n.4, p.363-366, 1989.

JOHNSON, C.; TELEN, M. J. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. **Haematologica**, v.93, n.4, p.481-486, 2008.

JOLY, P.; LACAN, P.; GARCIA, C.; DELASAU, A.; FRANCINA, A. Rapid and reliable  $\beta$ -globin cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. **Clinica Chimica Acta**, v.412, n.13-14, p.1257-1261, 2011.

KAN, Y. W.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human B-globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.75, n.11, p.5631-5635, 1978.

KATO, G. J. Defective nitric oxide metabolism in sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, v.62, n.3, p.373-374, 2015.

KOHEN, G.; PHILIPPE, N.; GODET, J. Polymorphism of the Hinf I restriction site located 1 Kb 5' to the human  $\beta$ -globin gene. **Human Genetics**, v.62, n.2, p.121-123, 1982.

KUZOLIK, A. E.; KAR, B. C.; SATAPATHY, R. K.; SERJEANT, B. E.; SERJEANT, G. R.; WEATHERALL, D. J. Fetal hemoglobin levels in  $\beta^S$ -globin haplotypes in an Indian population with sickle cell disease. **Blood**, v.69, n.6, p.1842-1846, 1987.

KUZOLIK, A. E.; WAINSCOAT, J. S.; SERJEANT, G. R.; KAR, B. C.; KAR, B. C.; AL-AWAMY, B.; ESSAN, G. J.; FALUSI, A. G.; HAQUE, S. K.; HILALI, A. M.; KATE, S. *et al.* Geographical survey of  $\beta^S$ -globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **American Society of Human Genetics**, v.39, n.2, p.239-244, 1986.

LABIE, D.; DUNDA-BELKHODJA, O.; ROUABHI, F.; PAGNIER, J.; RAGUSA, A.; NAGEL, R. L. The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. **Blood**, v.66, n.6, p.1463-1465, 1985a.

LABIE, D.; PAGNIER, J.; LAPOUMEROULIE, C.; ROUABHI, F.; DUNDA-BELKHODJA, O.; CHARDIN, P.; BELDJORD, C.; WACJAN, H.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. Common haplotype dependency of high  $\gamma^G$ -globin gene expression. and high HbF levels in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell anemia patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.7, p.2111-2114, 1985b.

LAPOUMÉROULIE, C.; DUNDA, O.; DUCROCQ, R.; TRABUCHET, G.; MONY-LOBÉ, M.; BODO, J. M.; CARNEVALE, P.; LABIE, D.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameron type. **Human Genetics**, v.89, n.3, p.333-337, 1992.

LAVAGEM MGM PLUS: solução. Curitiba, 2013. bula de reativo.

LEE, Y. J.; PARK, S. S.; KIM, J. Y.; CHO, H. I. RFLP, haplotypes of B-globin gene complex of  $\beta$ -thalassemic chromosomes in Koreans. **Journal of Korean Medical Science**, v.17, n.4, p.475-478, 2002.

LEHNINGHER, A. L. **Bioquímica**: replicação, transcrição e tradução da informação genética. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1977. v.4.

LIMA, ARG; RIBEIRO, VS.; NICOLAU, DI. Trends in mortality and hospital admissions of sickle cell disease patients before and after the newborn screening program in Maranhão, Brazil. *Brazilian journal of hematology and hemotherapy*. v. 37, nº1, p.12-16, 2015.

LIN, Z.; SUZOW, J. G.; FONTAINE, J. M.; NAYLOR, E. W. A simple automated DNA extraction method for dried blood specimens collected on filter paper. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v.10, n.5, p.310-314, 2005.

LINDENAU, J. D. R. **Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul**. 19p. Monografia - Instituto de Biociências, UFRSUL, Porto Alegre, 2009.

LIU, L.; MURALIDHAR, S.; SINGH, M.; SYLVAN, C.; KALRA, I. S.; QUINN, C. T.; ONYEKWERE, O. C.; PACE, B. S. High-density SNP genotyping to define  $\beta$ -globin locus haplotypes. **Blood, Cells, Molecules and Diseases**, v.42, p.16-24, 2009.

LIVINGSTONE, F. B. Who gave whom hemoglobin S: the use of restriction site haplotype variation for the interpretation of the evolution of the  $\beta^S$  globin gene. **American Journal of Human Biology**, v.1, n.3, p.289-302, 1989.

LOGGETTO, S. R. Diversidade clínica da anemia falciforme e haplótipos do gene da globina beta-S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.35, n.3, p.155-157, 2013.

LU, Z. H.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: relation to regulatory sequences cis to the  $\beta$ -globin gene. **Blood**, v.87, n.4, p.1604-1611, 1996.

LYRA, I. M.; GONÇALVES, M. S.; BRAGA, J. A. P.; GESTEIRA, M. F.; CARVALHO, M. H.; SAAD, S. T. O.; FIGUERIEDO, M. S.; COSTA, F. F. Caracterização clínica hematológica e molecular de crianças portadoras de anemia falciforme em duas diferentes cidades do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.4, p.1287-1290, 2005.

MACHADO, C. Cor e hierarquia social no Brasil escravista: o caso do Paraná, passagem do século XVIII para o XIX. **Topoi**, v.9, n.17, p.45-66, 2008.

MACHADO, R. F. P. Hipertensão arterial pulmonar associada à anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n.5, p.583-591, 2007.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, n.8, p.1237-1243, 2006.

MALVA-SILVA, A. I. Importância dos haplótipos do gene da globina  $\beta$ -S na hemoglobinopatia SC. 57p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2008.

MARCONDES, G. G.; ABREU, A. T. G. **Escravidão e trabalho**. Guarapuava: Fundação Universidade Estadual do Centro-Oeste - Unicentro, 1991.

MARCUS, J. S.; KINNEY, T. R.; SCHULTZ, W. H.; O'BRANSKI, E. E.; WARE, R. E. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v.54, n.1, p.40-46, 1997.

MENEZES, J. F. Estudo de polimorfismos em genes de moléculas associadas ao estresse oxidativo na doença falciforme: associação com dados hematológicos, bioquímicos e fenotípicos. 287p. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, 2010.

MILLER, S. T.; SLEEPER, L. A.; PEGELOW, C. H.; ENOS, L. E.; WANG, W. C.; WEINER, S. J.; WETHERS, D. L.; SMITH, J.; KINNEY, T. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v.342, n.2, p.83-89, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, DF: ANVISA, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - DGITS/SCTIE Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). **Relatório n.º 57**. Brasília, jun. 2013a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças falciformes**: condutas básicas para tratamento. Brasília, DF: Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada, 2013b.

MONTH, S. R.; WOOD, R. W.; TRIFILLIS, P. T.; ORCHOWSKI, P. J.; SHARON, B.; BALLAS, S. K.; SURREY, S.; SCHWARTZ, E. Analysis of 5' flanking regions of the gamma globin genes from major African haplotypes backgrounds associated with sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.85, n.2, p.364-370, 1990.

MURRAY, N.; SERJEANT, B. E.; SERGEANT, G. R. Sickle cell-hereditary persistence of fetal haemoglobin and its differentiation from other sickle cell syndromes. **British Journal of Haematology**, v.69, n.1, p.89-92, 1988.

NAGEL, R. L. Hemoglobins: normal and abnormal. In: NATHAN, D. G.; ORKIN, S. H.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. **Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood**. 6.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003. v.1. p.745-785.

NAGEL, R. L.; ERLINGSSON, S.; FABRY, M. E.; CROIZAT, H.; SUSUKA, S. M.; LACHMAN, H.; SUTTON, M.; DRISCOLL, C.; BOUHASSIRA, E.; BILLETT, H. H. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-american sickle cell anemia patients. **Blood**, v.77, n.6, p.1371-1375, 1991.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; PAGNIER, J.; ZOHOUN, I.; WAJCMAN, H.; BAUDIN, V.; LABIE, D. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. **New England Journal of Medicine**, v.312, n.14, p.880-884, 1985.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; STEINBERG, M. H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v.17, n.3, p.167-178, 2003.

NAGEL, R. L.; RAO, S. K.; DUNDA-BELKHODJA, O.; CONNOLLY, M. M.; FABRY, M. E.; GEORGES, A.; KRISHNAMOORTHY, R.; LABIE, D. The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between  $\gamma^G$  and HbF level. **Blood**, v.69, n.4, p.1026-1030, 1987.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.1, p.5-22, 2000.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doenças das células falciformes**. São Paulo: Sarvier, 2004.

NDUGWA, C.; HIGGS, D.; FISHER, C.; HAMBLETON, I.; MASON, K.; SERJEANT, B. E.; SERJEANT, G. R. Homozygous sickle cell disease in Uganda and Jamaica - A comparison of Bantu and BEN haplotypes. **West Indian Medical Journal**, v.61, n.7, p.684-691, 2012.

NEVILLE, KA.; PANEPINTO, J. Pharmacotherapy of sickle cell disease In: Expert Committee on the selection and use of essential medicines. 21 a 25 março, 268 p, 2011, Ghana, World Health Organization.

NISHIKAWA, R. B. **Terras e imigrantes na colônia de Assunguy: Paraná 1854-1874**. Dissertação (Mestrado em Ciências Humanas) - USP, São Paulo, 2007.

OGEDEGBE, H. O.  $\beta$  globin gene cluster haplotype analysis as a predictor of sickle cell disease severity. **LabMedicine**, v.38, n.9, p.563-568, 2007.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.35, n.1, p.71-72, 2013.

ONER, C.; DIMOVSKI, A. J.; OLIVIERI, N. F.; SCHILIRO, G.; CODRINGTON, J. F.; FATTOUM, S.; ADEKILE, A. D.; ÖNER, R.; YÜREGIR, G. T.; ALTAY, C.; GURGEY, A.; GUPTA, R. B.; JOGESSAR, V. B.; KITUNDU, M. N.; LOUKOPOULOS, D.; TAMAGNINI, G. P.; RIBEIRO, M. L. S.; KUTLAR, F.; GU, L.-H.; LANCLOS, K. D.; HUISMAN, T. H. J.  $\beta^S$  haplotypes in various world populations. **Human Genetics**, n.89, n.1, p.99-104, 1992..

ORKIN, S. H.; KAZAZIAN JR., H. H.; ANTONARAKIS, S. E.; GOFF, S. C.; BOEHM, C. D.; SEXTON, J. P.; WABER, P. G.; GIARDINA, P. J. V. Linkage of  $\beta$ -thalassaemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human  $\beta$ -globin gene cluster. **Nature**, v.296, n.5858, p.627-631, 1982.

ORKIN, S. H.; NATHAN, D. G. The thalassemias In: NATHAN, D. G.; ORKIN, S. H.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. **Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood**. 6.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003. v.1. p.745-785.

PAGNIER, J.; MEARS, J. G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K. E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R. L.; LABIE, D. Evidence for the multi-centric origin of the sickle cell hemoglobin gene in África. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.81, n.6, p.1771-1773, 1984.

PANDEY, S.; PANDEY, S.; MISHRA, R. M.; SAXENA, R. Modulating effect of the -158  $\gamma^G$  (C→T) Xmn1 polymorphism in Indian sickle cell patients. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, n.4, 2012, Disponível em: <<http://www.mjhid.org/article/view/9127>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

PANTE-DE-SOUSA, G.; MOUSINHO-RIBEIRO, R. C.; SANTOS, J. M.; ZAGO, A.; GUERREIRO, J. F. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.4, p.1-6, 1998.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sick cell anemia, a molecular disease. **Science**, v.110, n.10, p.543-548, 1949.

PEREIRA, J. B. B. Os imigrantes na construção histórica da pluralidade étnica brasileira. **Revista USP-São Paulo**, n.46, p.6-29, 2000.

PHONEUTRIA tecnologia a serviço KIT PARA CALIBRAÇÃO DE PCR PHT. Disponível em: <<http://phoneutria.com.br/site2/wp-content/uploads/2012/09/Kit-para-calibra%C3%A7%C3%A3o-de-PCR-dNTP.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

PIEL, F. B.; HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. **Scientific Reports**, v.3, p.1671, 2013.

POWARS, D. R.; HITI, A.; RAMICONE, E.; JOHNSON, C.; CHAN, L. Outcome in hemoglobin SC disease: a four decade observational study of clinical, hematologic and genetics factors. **American Journal of Hematology**, v.70, n.3, p.206-215, 2002.

POWARS, D. R.; MEISEMAN, H. J.; FISHER, T. C.; HITI, A.; JOHNSON, C.  $\beta^S$  gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia. Use in predicting clinical severity. **American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v.16, n.1, p.55-61, 1994.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DALAIO, M. M. O.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African and Amerindian contribution to the White and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, v.72, n.4, p.597-617, 2000.

QUEIROZ, R. F.; LIMA, E. S. Oxidative stress in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.35, n.1, p.16-17, 2013.

QUINN, C. T.; LEE, N. J.; SHULL, E. P.; AHMAD, N.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. **Blood**, v.111, n.2, p.544-548, 2008.

QUINN, C. T.; SHULL, E. P.; AHMAD, N.; LEE, N. J.; ROGERS, R. Z.; BUCHANAN, G. R. Prognostic significance of early vaso-occlusive complications in children with sickle cell anemia. **Blood**, v.109, n.1, p.40-45, 2007.

RAHIM, F.; KAEIKHAEI, B.; MOHAMMAD, T. A. Application of diagnostic methods and molecular diagnosis of hemoglobin disorders in Khuzestan province of Irã. **Indian Journal of Human Genetics**, v.13, n.1, p.1-15, 2007.

RAHIMI, Z.; KARIMI, M.; HAGHSHENASS, M.; MERAT, A.  $\beta$ -Globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from southwest Iran. **American Journal of Hematology**, v.74, n.3, p.156-160, 2003.

RAHIMI, Z.; PARSIAN, A. Sickle cell disease and venous thromboembolism. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, n.3, 2011.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALCONA, F.; MULLIS, K.; HOM, G. T.; ERLICH, H. A.; AM-HEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, n.4732, p.1350-1354, 1985.

SALEH-GOHARI, N.; MOHAMMADI-ANAIE, M. Co-inheritance of sickle cell trait and thalassemia mutations in south central Irã. **Iranian Journal of Public Health**, v.41, n.10 p.81-86, 2012.

SALLES, R. P. **Identificação dos haplótipos do gene  $\beta^S$  e aspectos hematológicos em indivíduos com anemia falciforme em Campo Grande, MS.** 70p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

SAMARAH, F.; ATHANASIOU-METAXA, M.; VAVATSI-CRHISTAKI, N. Genetics modulators of sickle cell disease. **Aristotle University Medical Journal**, v.34, n.2, p.25-35, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.1.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.3, n.1, p.1-13, 2013.

SANTOS, G. E. O. **Cálculo amostral:** calculadora on-line. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: 20 set. 2014.

SARNAIK, S. A.; BALLAS, S. K. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. **American Journal of Hematology**, v.67, n.3, p.179-182, 2001.

SILVA, D. G. H.; BELINI JR., E.; CARROCINI, G. C. S.; TORRES, L. S.; RICCI JR, O.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; ALMEIDA, E. A. Genetic and biochemical markers of hydroxyurea therapeutic response in sickle cell anemia. **BMC Medical Genetics**, v.14, p.1-9, 2013.

SILVA FILHO, I. L. S.; LEITE, A. C. C. B.; MOURA, P. G.; RIBEIRO, G. S.; CAVALCANTE, A. C.; AZEVEDO, F. C. M.; ANDRADA-SERPA, M. J. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.69, n.3, p.431-435, 2011.



SILVA FILHO, I. L.; RIBEIRO, G. S.; MOURA, P. G.; VECCHI, M. L.; CAVALCANTE, A. C.; ANDRADA-SERPA, M. J. Manifestações clínicas agudas na primeira e segunda infâncias e características moleculares da doença falciforme em um grupo de crianças do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.34, n.3, p.196-201, 2012.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, R. P.; RABENHORST, S. H. B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.2, p.115-118, 2009.

SILVA, W. S. **Polimorfismo de DNA do complexo de genes da  $\beta$  globina em indivíduos normais e portadores de hemoglobinopatia no Recôncavo Baiano**. 134p. Tese (Doutorado] - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, W. S.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; GRISOLOA, C. K.  $\beta$ -globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, state of Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.3, p.411-417, 2010.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v.129, n.4, p.465-481, 2005.

STEINBERG, M. H.; HEBBEL, R. P. Clinical diversity of sickle cell anemia: genetic and celular modulation of disease severity. **American Journal of Hematology**, v.14, n.4, p.405-416, 1983.

STEINBERG, M. H.; LU, Z. H.; NAGEL, R. L.; VENKSTARAMANI, S.; MILNER, P. F.; HUEY, L.; SAFAYA, S.; RIEDER, R. F. Hematological effects of atypical and Cameroon  $\beta$ -globin gene haplotypes in adult sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, n.59, n.2, p.121-126, 1998.

STUART, M. J.; NAGEL, R. Sickle cell disease. **Lancet**, v.364, n.9442, p.1343-1360, 2004.

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.1, p.56-62, 2010.

SUAREZ, J. H. D. **Frecuencia de los haplótipos asociados a pacientes con anemia falciforme y el rasgo falciforme del Valle del Cauca**. Dissertação (Mestrado) - Universidad del Valle Facultad de Ciencias, Programa Academico de Biologia, Santiago de Calli, Colombia, 2011.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene cluster haplotype. **American Journal of Hematology**, v.32, n.1, p.66-69, 1989.

TANTAWY, A. A. G.; ADLY, A. A. M.; ISMAIL, E. A. R.; ALY, S. H. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in sickle cell disease: relation to vasculopathy and disease severity. **Pediatric Blood & Cancer**, v.62, n.3, p.389-394, 2015.

TEWARI, S; REES, D. Morbidity pattern of sickle cell disease in India: a single centre perspective. **Indian J Med Res.** v.138, n.3,p 288–290, 2013.

THOMAS, B. N.; THAKUR, T. J.; GUINDO, A.; DIALLO, D. A.; OTT, J. Extensive ethnogenomic diversity of endotelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. **Gene Regulation and System Biology**, n.7, p.1-10, 2013.

THOMPSON, J.; THOMPSON, M. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TOPLEY, J. M.; ROGERS, D. W.; STEVENS, M. C. G.; SERJEANT, G. R. Acute splenic sequestration and hyperesplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease. **Archives of Disease in Childhood**, v.56, n.10, p.765-769, 1981.

TORRES, L. S. T.; OKUMURA, J. V.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.37, n.2, p.120-126, 2015.

TRENTO, A. **Do outro lado do Atlântico**: um século de imigração italiana no Brasil. São Paulo: Nobel, 1989.

UHLMANN, V.; SILVA, I.; LUTTICH, K.; PICTON, S.; O'LEARY, J. J. In cell amplification. **Molecular Pathology**, v.51, n.3, p.119-130, 1998.

VIANA, MB. The invisibility of sickle cell disease in Brazil: lessons from a study in Maranhão. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 37, n.1, p. 5-6, 2015.

WAINSCOAT, J. S.; THEIN, S. L.; HIGGS, D. R.; BELL, J. I.; WEATHERALL, D. J.; AL-AWAMY, B. H.; SERJEANT, G. R. A genetic marker for elevated levels of haemoglobin F in homozygous sickle cell disease? **British Journal of Haematology**, v.60, n.2, p.261-268, 1985.

WATANABE, A. M.; PIANOVSKI, M. A. D.; NETO, J. Z.; LICHTVAN, L. C. L.; FREIRE-MAIA, E. A. C.; DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O. Prevalência da HbS no estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, v 24, n.5, p.993-1000, 2008.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B.; HIGGS, D. R.; WOOD, W.G. The hemoglobinopathies. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; VALE, D.; SLY, W. S.; CHILDS, B.; KINEZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8.ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. v.3. p.4571-4636.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. 3.ed. New York: Wiley-Vch, 2001.

WHO (World Health Organization). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived services indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 6, p. 480-487, 2008.

WU, D. Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B. K.; WALLACE, B. Allele-specific enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.8, p.2757-2760, 1989.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu  $\beta^S$  cluster haplotype predominates among brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v.88, n.3, p.295-298, 1992.

ZAGO, M. A.; SILVA PINTO, A. C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

**Sites consultados:**

<http://thumbs.dreamstime.com/z/modelo-da-hemoglobina-humana-16049771.jpg>

<http://pt.slideshare.net/rhomelioanderson/aula-on-line3hemoglobinas-bases-moleculares-prof-ana-cristina>

[www.neb.com/tools\\_and\\_resources/interactive\\_tools/tmcalculator](http://www.neb.com/tools_and_resources/interactive_tools/tmcalculator)

## APÊNDICES

## APÊNDICE 1

### CARTAZ DE SENSIBILIZAÇÃO

#### VOCÊ SABE QUAL É O SEU HAPLÓTIPO??

Oi, Maria!! Você viu que o Hospital de Clínicas vai participar de uma pesquisa sobre os haplótipos de todas as pessoas que têm anemia falciforme?



Que legal!! Mas.... O que é haplótipo e para que serve???

Haplótipos são um grupo de características genéticas transmitidas dos pais para os filhos. No caso da anemia falciforme, dependendo do haplótipo, a anemia pode se manifestar de diferentes maneiras... Os haplótipos conhecidos são: **BENIN, BANTU, SENEGAL, ÁRABE-INDIANO e CAMARÕES.**



Ah! É por isso que tem pacientes com sintomas diferentes, mesmo sendo uma mesma anemia!!!

Como esta pesquisa vai ser feita?



Estas características genéticas vão ser pesquisadas no laboratório, através da análise de uma pequena gota de sangue. Não vai ser coletado nada mais do que é coletado para os exames de rotina...



#### VAMOS PARTICIPAR DESTA PESQUISA????

Contatos: Dra Maria Platonovski / Dra Leniza – HC // Farmacêutica Alexandra – 9645-21-97  
(março/2012)

## APÊNDICE 2

### DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS SS POR REGIONAL DE SAÚDE

GENÓTIPO SS n=100	REGIONAL DE SAÚDE	QTDAD	CIDADES
CAR/CAR n=62	2. <sup>a</sup>	31	Curitiba e região metropolitana 31
	3. <sup>a</sup>	3	Arapoti 1//Porto Amazonas 1 //Pirai do Sul 1
	5. <sup>a</sup>	1	Guarapuava 1
	7. <sup>a</sup>	5	Palmas 1//Itapejara d'Oeste 4
	8. <sup>a</sup>	2	Capanema 1 // FBeltrão 1
	9. <sup>a</sup>	2	Foz Iguaçu//Sta Terezinha 1
	11. <sup>a</sup>	4	Goioere1 //Campina Lagoa 2// Mamborê 1
	12. <sup>a</sup>	2	2- Umuarama 2
	15. <sup>a</sup>	3	Maringá 2 //Atalaia 1
	16. <sup>a</sup>	2	Apucarana 1//Arapongas 1
	18. <sup>a</sup>	2	Bandeirantes 1 //Nova Santa Barbara 1
	19. <sup>a</sup>	2	Santo Antonio da Platina 2
	20. <sup>a</sup>	1	Toledo 1
CAR/BEN n=20	21. <sup>a</sup>	2	Imbau 2
	1. <sup>a</sup>	1	Paranagua 1
	2. <sup>a</sup>	15	Curitiba 13
	14. <sup>a</sup>	1	Amaporã 1
	15. <sup>a</sup>	1	Corumbatai do Sul 1
	16. <sup>a</sup>	2	Sertaneja 1//Apucarana 1
CAR/Satp n= 6	19. <sup>a</sup>	1	Ibaiti 1
	20. <sup>a</sup>	1	Guaira 1
	1. <sup>a</sup>	1	Matinhos 1
BEN/BEN n= 6	2. <sup>a</sup>	3	Curitiba 3
	19. <sup>a</sup>	1	Figueira (Jacarézinho) 1
	2. <sup>a</sup>	4	Curitiba 3// Araucaria 1
BEN/Atp n = 2	11. <sup>a</sup>	1	Peabiru (C. Mourão) 1
	18. <sup>a</sup>	1	Andirá 1
	5. <sup>a</sup>	1	Guarapuava 1
CAR/CAM n=1	14. <sup>a</sup>	1	Paranavai 1
CAR/SEN n=1	3. <sup>a</sup>	1	Jaguariava 1
Atp/Atp n=1	19. <sup>a</sup>	1	Siqueira Campos 1
	2. <sup>a</sup>	1	Almirante Tamandaré 1

FONTE: A autora

### APÊNDICE 3

#### DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA S-TALASSEMIA $\beta$ POR REGIONAL DE SAÚDE

S $\beta$ -TALASSEMIA n=45	REGIONAL DE SAÚDE	QTDADE	CIDADE (PACIENTES)
CAR/ $\beta$ I 11	2. <sup>a</sup>	5	Curitiba (6)
	7. <sup>a</sup>	2	Domingos Soares (2)
	16. <sup>a</sup>	1	Apucarana (1)
	18. <sup>a</sup>	1	Cornelio Procopio (1)
	19. <sup>a</sup>	1	Santo Antonio Platina (1)
CAR/ $\beta$ II 10	2. <sup>a</sup>	3	Curitiba (2) Alm. Tamandare (1)
	10. <sup>a</sup>	1	Cascavel(1)
	11. <sup>a</sup>	2	CampoMourão (2)
	18. <sup>a</sup>	2	Bandeirantes(1)//Cornélio Procopio (1)
	19. <sup>a</sup>	1	Jacarezinho (1)
	13. <sup>a</sup>	1	Japura (1)
CAR/ $\beta$ VI 2	10. <sup>a</sup>	1	Cascavel (1)
	20. <sup>a</sup>	1	Toledo (1)
CAR/ $\beta$ IX 3	2. <sup>a</sup>	1	Curitiba (1)
	7. <sup>a</sup>	1	Mangueirinha (1)
	15. <sup>a</sup>	1	Maringá(1)
CAR/ $\beta$ atp 12	7. <sup>a</sup>	1	Mangueirinha (1)
	2. <sup>a</sup>	6	Curitiba2//Pinhais 1 //Fazenda Rio Grande 1 //Campina Grande do Sul 1//Piraquara 1
	10. <sup>a</sup>	1	Nova Aurora 1
	16. <sup>a</sup>	3	Nova América da Colina 3
	17. <sup>a</sup>	1	Cambé 1
Satp / $\beta$ I - 2	16. <sup>a</sup>	2	Marilandia do Sul 2
BEN/ $\beta$ I - 1	14. <sup>a</sup>	1	Tamboara 1
BEN/ $\beta$ II - 1	15. <sup>a</sup>	1	Maringá 1
BEN/ $\beta$ IX - 1	2. <sup>a</sup>	1	Curitiba 1
BEN/ $\beta$ atp 2	2. <sup>a</sup>	1	Curitiba 1
	20. <sup>a</sup>	1	Toledo 1

FONTE: A autora

## APÊNDICE 4

### DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DA Hb SC POR REGIONAL DE SAÚDE

GENÓTIPO SC n=49	REGIONAL DE SAÚDE	QTDADÉ	LOCALIDADES
CAR/CI 24	2. <sup>a</sup>	10	RioNegro 1 //Colombo 2 //Piraquara 1//-São José dos Pinhais 1 //Curitiba 5
	3. <sup>a</sup>	1	Arapoti 1
	5. <sup>a</sup>	2	Guarapuava 2
	7. <sup>a</sup>	2	Itapejara d'Oeste 1//Pato Branco 1
	9. <sup>a</sup>	1	S.Miguel do Iguaçu 1
	13. <sup>a</sup>	1	Tuneiras d'Oeste 1
	14. <sup>a</sup>	1	Guairaca 1
	15. <sup>a</sup>	1	Presidente Catelo Branco 1
	16. <sup>a</sup>	2	Arapongas 1//Faxinal 1
	17. <sup>a</sup>	2	Pitangueiras1 //Londrina 1
	xx	xx	Xxxxxxxxxxxxxxxx
CAR/C II 3	1. <sup>a</sup>	1	1-Paranagua 1
	2. <sup>a</sup>	2	Curitiba 1//Piraquara 1
CAR/CIII 1	17. <sup>a</sup>	1	Londrina 1
CAR/Catp 4	2. <sup>a</sup>	4	Colombo 2 // Campina Grande do Sul 2
Satp/CI 1	18. <sup>a</sup>	1	Bandeirantes 1
BEN/CI 15	2. <sup>a</sup>	3	Curitiba 1 // Campina Grande Sul 2
	9. <sup>a</sup>	2	Foz Iguaçu 2
	11. <sup>a</sup>	4	Goio-ere 1 // Campo Mourão 2 // Barbosa Ferraz 1
	12. <sup>a</sup>	2	Umuarama 2
	15. <sup>a</sup>	1	Maringá 1
	16. <sup>a</sup>	1	Arapongas 1
	17. <sup>a</sup>	1	Alvorada do Sul 1
	20. <sup>a</sup>	1	Toledo 1
BEN/CII 1	16. <sup>a</sup>	1	Apucarana 1
TOTAL N=49		49	

FONTE: A autora



## **ANEXOS**

**ANEXO 1 - Termo de Aprovação pelo Comitê de Ética**

2ª VIA



Curitiba, 17 de fevereiro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Alexandra Mitiru Watanabe**  
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “PREVALÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE HEMOGLOBINA FALCÊMICA NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA”, foi analisado COM PENDÊNCIA pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 30 de novembro de 2010. Após, analisada as respostas das pendências encaminhadas pela pesquisadora, este CEP/HC considera o projeto aprovado em 17 de fevereiro de 2011. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0295.0.208.000-10**  
**Registro CEP: 2369.263/2010-11**

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do primeiro relatório: 17 de agosto de 2011.**

Atenciosamente,

**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

## ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado (a) \_\_\_\_\_ (Nome do paciente)

Você está neste ambulatório para fazer o tratamento e acompanhamento da anemia falciforme. Por isso, gostaríamos de convidá-lo (la) a participar do projeto de pesquisa **“PREVALÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE HEMOGLOBINA FALCÊMICA NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA”**.

Estamos desenvolvendo esta pesquisa pois verificamos, através de estudos e da observação dos médicos que tratam dos seus pacientes, que existe diferença de sintomas entre eles. Uns têm sintomas mais graves e outros mais brandos. Essa característica pode ter sido herdada de seus pais que por sua vez, herdaram dos seus avós. Essa característica que você herdou, que chamamos de característica genética é que gostaríamos de estudar em você.

- 1) Por isso, peço o seu (ou do seu responsável) consentimento para coletar 5 ml de sangue periférico (preferencialmente do braço) para esta pesquisa. Caso já tenha sido coletado para os exames de rotina, solicito o seu consentimento para usar esta amostra para realizar os testes complementares para este estudo ou se necessário, coletar nova amostra de sangue.
- 2) Peço também que você ou o responsável (quando criança) responda ao questionário que vai ser perguntado pela médica que faz o seu acompanhamento. Não se preocupe pois não haverá a sua identificação. O importante é que você seja o mais sincero(a) possível.
- 3) Não haverá nenhum tipo de gasto para você ou sua família, apenas a sua adesão voluntária.
- 4) Você pode aceitar ou não aceitar participar desta pesquisa. Mesmo que aceite agora, também pode desistir no meio da pesquisa, dizendo para nós (em um dos telefones abaixo) que não quer mais participar e retiraremos o seu nome da pesquisa.
- 5) Sinta-se à vontade para perguntar a uma de nós as suas dúvidas ou esclarecimentos.
- 6) Se você tiver dúvidas sobre sua participação, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-1896.

- ( ) Sim, vou participar (paciente ou representante legal)  
 ( ) Não, não vou participar (paciente ou representante legal)

Qualquer que seja a sua resposta, agradecemos e estaremos sempre à sua disposição.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Albonei D. Pianovski (41) 8819-60-55. E-mail: albonei@yahoo.com.br

Prof.<sup>a</sup> Leniza Costa Lichtvan (41) 9186-2490. E-mail: lenizacl@hotmail.com

Alexandra M. Watanabe (41) 3281- 4000 Rm 342 (manhã) / (41) 3111-1848 (tarde) - (41) 9645-2197 e-mail: alemwatanabe@hotmail.com.

NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA

Local, dia, mês, ano \_\_\_\_\_

**ANEXO 3 - TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO (14 a 18 anos)****TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO (14 a 18 anos)**

**Assentimento informado para \_\_\_\_\_ (Nome da criança/adolescente)**

**Data de nascimento: \_\_\_\_\_ idade: \_\_\_\_\_**

Estamos trabalhando em um projeto de pesquisa chamado **PREVALÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE HEMOGLOBINA FALCÊMICA NO ESTADO DO PARANÁ E EVOLUÇÃO CLÍNICA**. Esta pesquisa fará um estudo mais aprofundado no sangue de pacientes que têm anemia falciforme. Muitos pacientes com anemia falciforme precisam de muito tratamento e outros não, apesar de ser o mesmo tipo de anemia. Essa variação pode ser devida a característica genética que o(a) paciente herdou de seus pais. Por isso, queremos estudar o sangue destes pacientes para identificar se esta substância está influenciando ou não nos sintomas. Achamos que esta pesquisa poderá ajudar a esclarecer este fato.

A pesquisa de características genéticas nas crianças e nos adolescentes com anemia falciforme é muito importante pois vai permitir que o paciente, conhecendo-as, possa combater melhor as crises ou os sintomas quando elas aparecerem. Além disso, quando precisar ir ao médico ou ao hospital, terá uma informação a mais para passar para eles, o que poderá direcionar um tratamento mais específico para o seu caso.

Ao mesmo tempo que lhe informo, gostaria de convidá-lo(la) a participar desta pesquisa. Falamos com seu pai - mãe - responsável e eles sabem que também estamos pedindo a sua aceitação. Você pode discutir qualquer informação deste formulário com seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade de conversar. Você pode decidir se quer participar ou não depois de ter conversado sobre a pesquisa e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver palavras que não entenda ou coisas que você queira que eu explique mais detalhadamente porque você ficou mais interessado(a) ou preocupado(a). Pode ligar para mim ou peça ao médico (a) que está lhe atendendo lhe explicar.

Se você concordar em participar na pesquisa, seus pais ou responsáveis vão concordar. Se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado(a), mesmo que seus pais concordem. É você quem decide. Se decidir não participar da pesquisa, é seu direito e nada mudará no seu tratamento de saúde. Ainda assim, este serviço de saúde sempre estará disponível para você. Mesmo que você tenha dito "sim" agora, poderá mudar de idéia depois, sem nenhum problema.

Para você não mudará nada. A única coisa que precisamos é coletar um pouco mais de sangue (que já é feito de rotina) para fazer os testes de laboratório para esta pesquisa. Caso dê algum problema na realização do exame, pode ser que seja necessário coletar nova amostra de sangue. Mas nada fora da rotina que você já conheça e participa. Como percebeu, será só o desconforto da picada da agulha, que você já bem conhece. Gostaria também que você me autorizasse a analisar os resultados laboratoriais que ficam junto com a sua ficha médica.

O resultado vai demorar um pouco, mas assim que sair, o seu médico vai ser informado e vai lhe repassar o resultado e as explicações. Os resultados dessa pesquisa vão trazer informações genéticas importantes para sua família e para a comunidade em geral; por isso também serão divulgados nos meios científicos, o que vai trazer melhor conhecimento sobre o assunto.

As informações sobre você serão coletadas na pesquisa e ninguém, exceto a farmacêutica Alexandra, a Dr.<sup>a</sup> Mara, Dr.<sup>a</sup> Leniza e os médicos que tratam de você poderão ter acesso a elas. Você será identificado por um número ao invés de seu nome. Só os pesquisadores - farm. Alexandra, a Dr.<sup>a</sup> Mara, a Dr.<sup>a</sup> Leniza e outros médicos da equipe da Dr.<sup>a</sup> Mara saberão qual é o seu número que manteremos em sigilo. Ela não será compartilhada com quem quer que seja.

Você é livre para fazer parte desta pesquisa ou não. Essa escolha não mudará em nada o esquema de tratamento. Será apenas uma colaboração da sua parte para que possamos conhecer ainda mais sobre a doença e com isso tentar trazer melhorias não somente para você mas para os outros pacientes que têm a mesma doença.

Caso queira conversar, esclarecer dúvidas, ou fazer perguntas, sinta-se bem à vontade.

As pessoas que fazem parte desta equipe que podem esclarecer suas dúvidas são:

Alexandra M. Watanabe - farmacêutica - (41) 9645-2197

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Albonei D. Pianovski - médica hematologista - (41) 8819-6055

Dr.<sup>a</sup> Leniza Lichtvan Costa médica hematologista (41) 9186-2490

Se não se sentir confortável em ligar para nós, pode pedir para alguém ligar e fazer as perguntas.

### **Certificado do Assentimento**

Eu entendi que a pesquisa é sobre uma pesquisa na área de genética, para conhecer características do meu sangue, que foram herdados dos meus pais, que poderão esclarecer muito dos sinais e sintomas que desenvolvo, diferente de outros pacientes que também têm a anemia falciforme.

Assinatura da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Assinatura dos pais/responsáveis: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(Pai)

(Mãe)

Local/ dia/mês/ano: \_\_\_\_\_

## ANEXO 4 - PROTOCOLO DE ATENDIMENTO DE PACIENTES COM DOENÇAS FALCIFORMES

Unidade de Ambulatórios	
<b>ANEMIA FALCIFORME</b>	
Cliente: _____	Registro:
Data: ____/____/____	Data de nascimento: ____/____/____ Idade ____ anos
Data última transfusão: ____/____/____	Motivo e data do último internamento: ____/____/____
Revisão prontuário: _____	
Últimos exames: _____	
Queixas: _____	
Dor (início, intensidade, tipo, fator de melhora ou piora): _____	
Febre (início, temperatura): _____	
Tolerância a atividades físicas: _____	
Rendimento escolar: _____	
Atividades sociais: _____	
Medicamentos em uso: _____	
<b>Exame Físico</b>	
Peso: _____ ( P )	Estatura: _____ ( P )
F.C.: _____ b.m.p	F.R.: _____ i.m.p
P.A.: _____ mmHg	P.C.: _____ ( P )
	Temp.: _____ °C
Cabeça pescoço: _____	
Otoscopia: _____	Oroscopia: _____
Precórdio: _____	
C.P.P.: _____	
Abdome: _____	
Fígado: _____ cm	Baço: _____ cm
Membros: _____	
Exame neurológico: _____	
Desenvolvimento sexual (Turner): _____	
Avaliação: HT _____ %	
Condução e retorno: Transfusão: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	
Volume: _____ ml	
Responsável pelo atendimento: _____	
Liberação: _____	